

ADAMARA MACHADO NASCIMENTO

POLISSACARÍDEOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
***Spilanthes oleracea* L. (JAMBU)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Thales R. Cipriani
Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA

2012

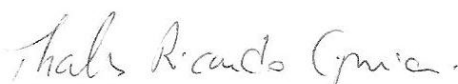
Orientador: Prof. Dr Thales Ricardo Cipriani
Co-Orientador : Prof. Dr. Marcello Iacomini

TERMO DE APROVAÇÃO

ADAMARA MACHADO NASCIMENTO

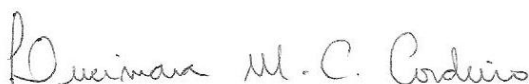
POLISSACARÍDEOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Spilanthes oleracea* L. (JAMBU)

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Profa. Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof. Dr. Ricardo Wagner

Depto. de Medicina Forense e Psiquiatria - UFPR

Curitiba, 16 de fevereiro de 2012

Com todo o meu amor, ao meu filho Lucca.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo seu favor em minha vida, por suas promessas, fidelidade e por ter sido sempre o meu refúgio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani, por todos os seus ensinamentos, orientação, paciência e por todo o apoio.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini pelo apoio, pela orientação e palavras de ânimo.

Ao Dr. Lauro Mera, pela colaboração nos experimentos relacionados à química de compostos de baixa massa, pela convivência, conversas e por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. Philip A. J. Gorin, pelo auxílio nas correções do inglês, por sempre ser tão acessível e solícito e pelas conversas animadas na hora do cafezinho.

A Prof. Dra. Maria Fernanda Werner e a Prof. Dra. Cristiane Baggio do Depto. de Farmacologia da UFPR pelo desenvolvimento dos testes de atividade antinociceptiva e antiúlcera gástrica.

A Rosane e à Eliz pelas análises de GC-MS, GLC e HPSEC-MALLS.

Ao Arquimedes pela ajuda em todas as análises (RMN e GC-MS), pelas risadas, conversas, amizade e pelos momentos descontraídos de laboratório.

Aos Professores: Dr. Miguel Nosedá, Dr. Diogo Ducatti e Dr. Guilherme L. Sassaki pelas análises de RMN.

A Prof. Msc. Rosângela de A. P. H. Souza, do Herbário da Universidade Federal do Acre, pela identificação da planta.

Aos amigos do laboratório: Yanna, Ana Helena, Larry, Nessana, Flávio, Fhernanda, Diego (Popó), Aramis, Juliane, Thaísa, Andréia e Geórgia, pelo apoio, pelas inúmeras ajudas, pelos almoços e pela convivência agradável. Especialmente a Nessa pelo apoio, conversas e ajuda durante os dois anos de mestrado.

Aos alunos de iniciação científica Nadiezda, Stéphanie, Simone e Aline pela convivência alegre, em especial a Nadiezda por sempre ter uma palavra amiga e pelas inúmeras ajudas nos experimentos.

Aos meus pais, Adão e Tamar, pela educação que me deram e por sempre acreditarem nos filhos, pelo amor, carinho e apoio.

A minha irmã Adamarcia, pelo apoio emocional, pela amizade verdadeira, pelas conversas infinitas nos finais de semana, por dividirmos os nossos sonhos. Ao meu irmão, Adamar que sempre me socorre, pelo apoio e por sempre estar por perto na minha vida.

A minha avó Alda, pelo aconchego, por seu colo sempre que preciso, pelos conselhos.

Aos meus tios Tégula e Ivan, por serem tão prestativos comigo e por terem me oferecido um lugar durante estes dois anos.

Ao Rafael, pelo amor, incentivo, compreensão, carinho nos momentos críticos e por todas as ligações diárias.

A todos os professores do Departamento, pelas disciplinas ministradas, pela contribuição para a minha formação e por terem me ensinado a gostar de Bioquímica.

A todos os colegas que conheci no Departamento de Bioquímica e a todos aqueles que direta ou indiretamente foram importantes para a realização deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, em nome do Prof. Dr. Miguel Nosedá que sempre esteve pronto para ajudar, desde a época da inscrição para prova.

Ao CNPq e Pronex-Carboidratos pelo auxílio financeiro.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades...”

Charles Chaplin

RESUMO

A planta *Spilanthes oleracea* L., conhecida popularmente como jambu, é comum da região Norte do Brasil, onde é largamente utilizada na alimentação como tempero em pratos típicos regionais e na medicina popular. Este trabalho apresenta a extração, purificação e caracterização de um polissacarídeo com atividade antiúlcera gástrica e o fracionamento bioguiado por atividade atinociceptiva de compostos de baixa massa molar de *S. oleracea*. Para a obtenção de polissacarídeos foi utilizada tanto a planta inteira como somente as folhas. O principal polissacarídeo extraído a partir da planta inteira apresentou Gal, Ara, Rha e GalA numa proporção molar de 36,5:18,3:12,4:8,6. Análise de metilação e espectroscopia de RMN indicaram que o polissacarídeo em questão era uma arabinogalactana do tipo II (AG II), formada por uma cadeia principal de unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 3)-ligadas, substituída em O-6 por cadeias laterais de β -D-Galp (1 \rightarrow 6)-ligadas. As cadeias laterais são substituídas em O-3 por terminais não redutores de α -L-Araf. Possivelmente esta AG II está ligada na posição O-4 de algumas unidades de ramnose, de uma ramnogalacturonana do tipo I (RG I), formada pela repetição da unidade dissacarídica [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow]. A partir das folhas, por extração aquosa, foi obtido um polissacarídeo que contém principalmente GalA, Gal, Ara, Rha e Glc em uma razão molar de 15:2:1:1:0,5 e M_w de 226.000 g/mol. Análise de metilação e espectroscopia de RMN indicaram que o polissacarídeo consiste de uma RG I composta por uma longa cadeia de \rightarrow 4)-6-OMe- α -D-GalpA-(1 \rightarrow , intercalada por umas poucas unidades de α -L-Rhap, parcialmente substituídas por cadeias laterais de AG II. Este polissacarídeo inibiu significativamente a formação de lesão gástrica induzida por etanol em ratos, com uma ED_{50} de 1,5 mg/kg, atuando como um potente agente gastroprotetor. O processo de fracionamento bioguiado dos compostos de baixa massa molar, obtidos a partir do extrato aquoso da planta inteira, gerou uma fração com grande atividade antinociceptiva (4B). De acordo com o processo de extração e fracionamento realizados, espilantol e outras alcanidas tradicionalmente associadas às propriedades anestésicas e analgésicas observadas para a planta, não estavam presentes nesta fração. Isso indica que outros compostos presentes em *S. oleracea* possuem atividade antinociceptiva.

Palavras-chave: *Spilanthes oleracea* L., polissacarídeos, antiúlcera.

ABSTRACT

The plant *Spilanthes oleracea* L., popularly known as jambu, is common plant in northern Brazil, where widely is used in food as a spice in typical regional dishes and folk medicine. This work presents the extraction, purification and characterization of a polysaccharide with gastric antiulcer activity and fractionation guided by antinociceptive activity of low molar mass compounds of *S. oleracea*. To obtain polysaccharides was used the whole plant as well as its leaves. The main polysaccharide extracted from the whole plant presented Gal, Ara, Rha, GalA in a 36,5:18,3:12,4:8,6 molar ratio. Methylation analysis and NMR spectroscopy indicated that the polysaccharide in question was a type II arabinogalactan (AG II), comprising a main chain with β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-linked units, substituted at O-6 by side chains of β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-linked. The side chains are substituted at O-3 by non-reducing end α -L-Araf units. It is possible that AG II is linked to O-4 of some rhamnose units of one type I rhamnogalacturonan (RG I) formed by the repetition of the disaccharide [\rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-1 \rightarrow]. From the leaves by aqueous extraction was obtained a polysaccharide containing mainly GalA:Gal:Ara:Rha:Glc in a 15:2:1:1:0.5 molar ratio and with a Mw 226,000 g/mol. Methylation analysis and NMR spectroscopy indicated that polysaccharide consists of a RG I composed of a long chain of -4)-6-OMe- α -D-GalpA-(1-, interspersed with a few units of α -L-Rhap, partly substituted by side chains of AG II. This significantly inhibited the formation of ethanol-induced gastric ulcers in rats at an ED₅₀ of 1,5 mg/kg, indicating that it acts as gastroprotective agent. The process of fractionation of low molecular weight compounds obtained from the aqueous extract of whole plant, led a fraction with large antinociceptive activity (4B). According to the process of extraction and fractionation performed, spilanthol and others alkamides traditionally associated with the anesthetic and analgesic properties observed for the plant, were not present in this fraction. This indicates that other compounds present in *S. oleracea* have antinociceptive activity.

Key-words: *Spilanthes oleracea* L., polysaccharide, antiulcer.

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 -	<i>Spilanthes oleracea</i> L.....	28
FIGURA 2 -	Modelo de estrutura de parede celular primária tipo I de dicotiledôneas (CARPITA e GIBEAUT, 1993).....	34
FIGURA 3 -	Estrutura química do espilantol (PHRUTIVORAPONGKUL, 2008).....	39
FIGURA 4 -	Fluxograma do processo de extração e fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração aquosa da planta inteira de <i>S. oleracea</i>	55
FIGURA 5 -	TLC da fração PSA obtida da planta inteira de <i>S. oleracea</i> . Fase móvel: <i>n</i> -propanol:água (7:3 v/v); Revelador: orcinol:H ₂ SO ₄ ; P1, P2 e P3 correspondem aos pontos de aplicação dos padrões.....	56
FIGURA 6 -	Espectros de RMN- ¹³ C das frações PSC e PSC-PD (em D ₂ O), e PSC-SD (em DMSO- <i>d</i> ₆), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	59
FIGURA 7 -	Perfis de eluição em HPSEC, utilizando detector de índice de refração (RID), das frações PBA, PSA, PPA, PSC, PPC e RAACA obtidas pelo processo de fracionamento dos polissacarídeos extraídos com água da planta <i>S. oleracea</i>	60
FIGURA 8 -	Espectros de RMN- ¹³ C de RAACA (em D ₂ O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. Inseto: DEPT-RMN- ¹³ C.....	62
FIGURA 9 -	Espectro de HSQC (RMN- ¹³ C/ ¹ H) de RAACA (em D ₂ O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	63
FIGURA 10 -	Estrutura sugerida para a arabinogalactana do tipo II e para a ramnogalacturonana do tipo I presentes na fração RAACA.....	66
FIGURA 11 -	Fluxograma do processo de extração e fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração aquosa das folhas de <i>S. oleracea</i>	67
FIGURA 12 -	Perfil de eluição em HPSEC, utilizando detector de índice de refração (RID), da fração SC obtida pelo processo de fracionamento dos polissacarídeos extraídos com água das folhas de <i>S. oleracea</i>	68
FIGURA 13 -	TLC das frações SC e SC-CR provenientes das folhas de <i>S. oleracea</i> . Fase móvel: <i>n</i> -propanol:água (7:3, v/v); Revelador: orcinol:H ₂ SO ₄ ; P1 e P2 correspondem aos pontos de aplicação	

dos padrões.....	69
FIGURA 14 - Espectros de RMN- ¹³ C de SC (em D ₂ O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. Inserto: DEPT-RMN- ¹³ C.....	71
FIGURA 15 - Espectro de HSQC (RMN- ¹³ C/ ¹ H) de SC (em D ₂ O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	72
FIGURA 16 - Espectro de HMBC (RMN- ¹³ C/ ¹ H) de SC (em D ₂ O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	73
FIGURA 17 - Esquema da estrutura sugerida para o polissacarídeo SC.....	74
FIGURA 18 - Efeito de SC (1, 3, 10 e 30 mg/kg, <i>p.o.</i>) contra lesões gástricas induzidas por etanol (C: controle, água 0,1 ml/100g, <i>v.o.</i> e Ome: omeprazol 40 mg/kg, <i>v.o.</i>). Os resultados são expressos como média ± S.E.M. (n=6-8). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. * <i>p</i> < 0,05 e *** <i>p</i> < 0,001 quando comparado ao grupo controle.....	75
FIGURA 19 - Efeito da fração SE quando administrada por via oral (A) e via intraperitoneal (B), na nocicepção visceral induzida por ácido acético (0,6%, <i>i.p.</i>). Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 7 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Valores de * <i>p</i> < 0,05 foram considerados estatisticamente diferentes do controle (veículo).....	76
FIGURA 20 - Fluxograma do processo de obtenção e fracionamento de SE, obtido a partir da extração aquosa da planta <i>S. oleracea</i>	77
FIGURA 21 - Efeito das frações SEFA e SEFB quando administradas por via intraperitoneal na nocicepção visceral induzida por ácido acético (0,6% <i>i.p.</i>). Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 7 a 10). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Valores de * <i>p</i> < 0,05 foram considerados estatisticamente diferentes do controle (veículo).....	78
FIGURA 22 - TLC das frações 1A, 2A, 3A, 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, 4G, 5A, 5B, 5C, 6A, 6B, obtidas a partir do fracionamento de SEFA por cromatografia em coluna de sílica gel.Revelador: orcinol:H ₂ SO ₄ e visualização em UV (280 nm).....	80
FIGURA 23 - Efeito das frações 1A, 2A, 3A, 4A, 4B, 4C E 4D-6B quando administradas por via intraperitoneal na nocicepção visceral induzida por ácido acético (0,6% <i>i.p.</i>). Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 7 a 10).	

A comparação entre os grupos foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Valores de $*p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes do controle (veículo).....	81
FIGURA 24 - Espectros de RMN- ^{13}C das frações 4BB (em DMSO- d_6), 4BA (em D_2O), 4BAAC (em D_2O) e 4BAAG (em D_2O), a 30 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	82
FIGURA 25 - TLC das frações 4BAAC e 4BAAG, juntamente com padrão sacarose (S).....	83
FIGURA 26 - TLC das frações 4BAAC e 4BAAG, juntamente com padrões de aminoácidos: glicina (Gly); valina (Val); serina (Ser); treonina (Thr); tirosina (Tyr); isoleucina (Ile); alanina (Ala); histidina (Hys); metionina (Met); prolina (Pro); serina (Ser); lisina (Lys); fenilalanina (Phe); glutamato (Glu); cisteína (Cys); arginina (Arg); leucina (Leu); aspartato (Asp); glutamina (Gln); asparagina (Asn); triptofano (Trp). Fase móvel: acetato de etila:ácido acético: <i>n</i> -propanol:água (4:2:2:1, v/v); Revelador: ninhidrina.....	85
FIGURA 27 - TLC das frações AC e AM. Fase móvel: acetato de etila:ácido acético: <i>n</i> -propanol:água (4:2:2:1). Reveladores: ninhidrina e orcinol: H_2SO_4	86
FIGURA 28 - TLC da fração AC. Padrões: rafinose (R); sacarose (S). Fase móvel: <i>n</i> -propanol:água (6:2) + 0,5% de ácido acético; Revelador: orcinol: H_2SO_4	86
FIGURA 29 - Espectro de RMN- ^{13}C da fração AC (em D_2O), a 30 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA DA PLANTA INTEIRA DE <i>S. oleracea</i> L.....	57
TABELA 2 - ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE RAACA E RAACA-CR.....	65
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE <i>S. oleracea</i> L.....	68
TABELA 4 - ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE SC E SC-CR.....	70
TABELA 5 - FRAÇÕES OBTIDAS PELO FRACIONAMENTO DE SEFA EM COLUNA DE SÍLICA GEL.....	79
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO 4BAAG ACETILADA (I), REDUZIDA E ACETILADA (II), E HIDROLISADA, REDUZIDA E ACETILADA (III).....	84
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO AC ACETILADA (ACI), REDUZIDA E ACETILADA (ACII), E HIDROLISADA, REDUZIDA E ACETILADA (ACIII).....	87
TABELA 8 - PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE AC	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ - HMBC	Two dimensional Heteronuclear (^1H , ^{13}C)-Multiple Bond Coherence
$^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -HSQC	“Two-dimensional heteronuclear (^1H , ^{13}C)- Hereronuclear Single Quantum Correlacion
4B	Fração com melhor atividade biológica, proveniente do sobrenadante etanólico, após fracionamento em coluna de sílica gel
4B	Fração com melhor atividade antinociceptiva resultante do fracionamento em coluna de sílica gel da fração SEFA
4BA	Fração resultante da partição líquido-líquido, solúvel em água, proveniente da fração 4B com butanol e água
4BA	Fração aquosa resultante da partição líquido-líquido de 4B
4BAAC	Fração proveniente do tratamento com acetona 3V, da fração 4BA, que ficou solúvel em acetona
4BAAG	Fração proveniente do tratamento com acetona 3V, da fração 4BA, que se separou da acetona
4BAC	Fração solúvel em acetona, proveniente da fração 4BA
4BAG	Fração separada da acetona, proveniente da fração 4BA.
4BB	Fração resultante da partição líquido-líquido, solúvel em butanol, proveniente da fração 4B com butanol e água
4BB	Fração butanólica resultante da partição líquido-líquido de 4B
AC	Fração solúvel no tratamento com resina catiônica
AC	Fração não retida em resina catiônica, proveniente de 4BAAG
AG I	Arabinogalactana do tipo I
AG II	Arabinogalactana do tipo II
AM	Fração retida na resina no tratamento com resina catiônica
AM	Fração retida em resina catiônica proveniente de 4BAAG
Ara	Arabinose
BA	Precipitado etanólico da extração aquosa

CMC	Carbodiimida
CuSO ₄	Sulfato de cobre
D ₂ O	Água deuterada
Da	Daltons
DEPT	“Distortionless enhancement by polarization transfer”
dn/dc	Taxa de variação do índice de refração com a concentração
ED ₅₀	Dose efetiva 50%
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g/mol	Gramas por mol
Gal	Galactose
GalA	Ácido galacturônico
GC	Cromatografia líquido-gasosa
GC-MS	Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa
Glc	Glucose
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPSEC-MALLS	Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance com Detector de Espalhamento de Luz de Multiângulos
i.p.	Intraperitoneal
I.R.	Índice de refração
kDa	KiloDáltons
m/z	Razão massa por carga
Man	Manose
Me	Grupamento metil (-CH ₃)
Me ₂ SO	Dimetilsulfóxido
Me ₂ SO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
MES	ácido etanosulfônico-2-[N-morfolina]
Mmol/l	Milimol por litro
NaB ² H ₄	Boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	Boroidreto de sódio

NaCl	Cloreto de sódio
NaN ₃	Azida de sódio
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nd	Não determinado
NH ₄ OH	Hidróxido de amônia
p/v	Peso por volume
PBA	Polissacarídeos brutos provenientes da extração aquosa
ppm	Partes por milhão
PSA	Polissacarídeos solúveis em tratamento por congelamento e degelo (planta inteira)
PPA	Polissacarídeos precipitados em tratamento por congelamento e de degelo (planta inteira)
PSC	Polissacarídeos solúveis em pH ácido (tratamento com ácido acético)
PSC-SD	Polissacarídeos solúveis em pH ácido, solúveis em Me ₂ SO à quente
PSC-PD	Polissacarídeos solúveis em pH ácido, precipitados em Me ₂ SO à quente
RAA	Polissacarídeos tratados com resina aniônica eluído com água
RAACA	Polissacarídeo tratado com resina aniônica e catiônica eluído com água
RG I	Ramnogalacturonanas do tipo 1
RG II	Ramnogalacturonanas do tipo II
Rha	Ramnose
RMN- ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
rpm	Rotações por minuto
SA	Fração solúvel do processo de congelamento e degelo à de extração aquosa de folhas de <i>S. oleracea</i> .
SC	Fração de polissacarídeo proveniente das folhas de <i>S. oleracea</i> por extração aquosa
SC-CR	Polissacarídeo SC carbóxirreduzido
SE	Sobrenadante etanólico da extração aquosa

SEFA	Fração aquosa da partição líquido-líquido do sobrenadante etanólico
SEFB	Fração butanólica da partição líquido-líquido do sobrenadante etanólico
T.A.	Temperatura ambiente
T.R.	Tempo de retenção
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Thin layer chromatography
TNR	Terminal não redutor
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
v.o.	Via oral
v/v	Volume por volume
Xyl	Xilose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Objetivos.....	23
1.1.1 Objetivo geral.....	23
1.1.2 Objetivos específicos.....	23
1.2	24
Justificativa.....	
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1 <i>Spilanthes oleracea</i> L.	26
2.1.1 Descrição botânica.....	26
2.1.2 Atividades biológicas relacionadas à <i>S. oleracea</i> L.....	28
2.1.3 Composição química da planta.....	30
2.2 Carboidratos de plantas.....	30
2.2.1 Parede celular de vegetais e polissacarídeos.....	31
2.2.1.1 Rhamnogalacturonanas do tipo I.....	34
2.2.1.2 Arabinogalactanas do tipo II.....	35
2.2.2 Atividades biológicas de polissacarídeos de plantas.....	36
2.2.3 Atividade antiúlcera de polissacarídeos.....	36
2.3 Metabólitos secundários de plantas.....	37
2.3.1 Alcamidas.....	38
2.4 Patentes envolvendo o jambu.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 Material de Estudo.....	42
3.2 Deslipidificação e Despigmentação do Material de Estudo.....	42
3.3 Extração de Polissacarídeos.....	42
3.3.1 Obtenção de polissacarídeos por extração aquosa.....	42
3.4 Purificação de Polissacarídeos.....	43
3.4.1 Fracionamento de polissacarídeos por congelamento e degelo.....	43
3.4.2 Fracionamento dos polissacarídeos por variação do pH do meio.....	43
3.4.3 Tratamento com α -amilase.....	44
3.4.4 Tratamento com dimetilsulfóxido (Me_2SO).....	44
3.4.5 Tratamento com resinas catiônica e aniônica.....	44

3.5 Análise Estrutural dos Polissacarídeos.....	45
3.5.1 Composição monossacarídica.....	45
3.5.2 Metilação dos polissacarídeos isolados e análise na forma de acetatos de alditóis.....	45
3.5.3 Carboxirredução.....	46
3.6 Teste de Homogeneidade e Determinação da Massa Molar.....	47
3.7 Métodos Analíticos.....	47
3.7.1 Cromatografia em camada delgada (TLC).....	48
3.7.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).....	48
3.7.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	48
3.7.4 Dosagem de ácidos urônicos.....	49
3.8 Fracionamento Bioguiado de Compostos de Baixa Massa Molar.....	49
3.8.1 Partição líquido-líquido do sobrenadante etanólico da extração aquosa...	49
3.8.2 Fracionamento em coluna de sílica gel.....	50
3.8.3 Partição líquido-líquido da fração 4B.....	50
3.8.4 Tratamento da fração 4BA com acetona 3 volumes.....	50
3.8.5 Tratamento da fração 4BAAG com resina catiônica.....	51
3.9 Testes de Atividade Biológica.....	51
3.9.1 Atividade antinociceptiva.....	51
3.9.1.1 Animais.....	51
3.9.1.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	52
3.9.1.3 Análise estatística.....	52
3.9.2 Atividade antiúlcera gástrica.....	53
3.9.2.1 Animais.....	53
3.9.2.2 Indução de lesão gástrica aguda em ratos.....	53
3.9.2.3 Análise estatística.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Extração e fracionamento de polissacarídeos obtidos a partir da planta inteira <i>S. oleracea</i> L.	55
4.1.1 Análise estrutural do polissacarídeos presente na fração RAACA obtida a partir de <i>S. oleracea</i> L.	61
4.1.1.1 Análise de metilação de RAACA.....	63
4.2 Extração e fracionamento de polissacarídeos obtidos a partir das folhas.....	67
4.2.1 Análise estrutural do polissacarídeo presente na fração SC	68
4.2.1.1 Análise de metilação de SC.....	69
4.2.1.2 Análise de RMN de SC.....	71
4.2.2 Avaliação da atividade antiúlcera gástrica da fração SC.....	75

4.3 Fracionamento bioguiado de compostos de baixa massa molar.....	76
---	-----------

5 CONCLUSÕES.....	90
--------------------------	-----------

REFERÊNCIAS.....	92
-------------------------	-----------

.

1 INTRODUÇÃO

A planta *Spilanthes oleracea* L. conhecida popularmente como jambú, agrião do Norte, agrião-bravo e agrião do Pará, cresce naturalmente em toda região da Amazônia Legal, no Norte do Brasil. A planta é largamente consumida na alimentação como tempero em pratos típicos regionais, dentre os quais o tacacá, o pato e a rabada no tucupi. Na medicina popular, suas folhas e flores são usadas para o tratamento de algumas desordens, incluindo afecções da boca e garganta, dores de dente, tuberculose, gripe e tosse. Também é usada como analgésico, anestésico local, antibacteriano, antifúngico e antimalárico.

Estudos prévios têm demonstrado algumas propriedades medicinais de *S. oleracea*, dentre as quais atividade anestésica (LEY *et al.*, 2006), anti-inflamatória (CHAKRABORTY *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2008), analgésica e antipirética (CHAKRABORTY *et al.*, 2010), antiobesidade (EKANEM *et al.*, 2007), efeito diurético (RATNASOORIYA *et al.*, 2004), e atuação antiplasmódica contra *P. falciparum* (MBEUNKUI *et al.*, 2011). Várias plantas da família Asteraceae, inclusive *S. oleracea* têm sido estudadas ao longo dos anos com o objetivo de avaliar a atividade inseticida e anestésica. Os estudos de Nakatani e Nagashima (1992), Ramsewak *et al.* (1999), Wu *et al.* (2008), Phrutivorapongkul *et al.* (2008) e Mbeunkui *et al.* (2011) apontam o espilantol, uma alcanida fixa presente na planta, como principal constituinte ativo, relacionado com as atividades anestésica, anti-inflamatória, inseticida e antiplasmódica observadas. A atividade diurética do chá de inflorescências, observada em camundongos, foi atribuída à presença de alcalóides (RATNASOORRIYA *et al.*, 2004), e Chakraborty *et al.* (2004; 2010) atribuíram os efeitos anti-inflamatório e antipirético, observados em camundongos, à presença de flavonóides. Os compostos químicos responsáveis por outras atividades da planta não são ainda conhecidos.

Os metabólitos de plantas utilizadas na medicina popular despertam o interesse científico, uma vez que a elucidação química de componentes de plantas medicinais, aliada ao estudo da atividade biológica, vem comprovar a eficácia dos usos populares.

Os polissacarídeos são metabólitos primários presentes em vegetais. Polissacarídeos de plantas têm sido relacionados com atividades biológicas, dentre

as quais antiviral, antitumoral, imunoestimulante, anti-inflamatória, anticomplemento, anticoagulante, hipoglicemiante e antiúlcera gástrica (SRIVASTAVA e KULSHVESHTHA, 1989; CAPEK *et al.*, 2003; YAMADA, 1994; NERGARD *et al.*, 2005, CIRPIANI *et al.*, 2006, 2009).

Quando a planta é consumida, na forma de infusos ou na alimentação, seus metabólitos podem ser absorvidos ou podem apresentar uma ação local. Uma planta pode conter centenas de metabólitos e a análise dessas substâncias é bastante complexa, pois nem sempre os componentes químicos em maior quantidade são os que apresentam melhor atividade. A análise da estrutura química dos metabólitos de vegetais, o desenvolvimento de técnicas de isolamento destes componentes e a avaliação dos seus efeitos biológicos constituem uma proposta interessante de pesquisa com as plantas medicinais. A biodiversidade de plantas encontradas na flora brasileira é vista com interesse pelas indústrias de medicamentos, cosméticos e de alimentos no mercado nacional e mundial.

Desta forma, este trabalho trata da extração, purificação e caracterização de polissacarídeos e metabólitos secundários da planta *S. oleracea*. Após isolamento e caracterização estrutural de um polissacarídeo, seu efeito antiúlcera gástrica foi avaliado, uma vez que esta propriedade tem sido verificada para polissacarídeos isolados de algumas plantas (SUN *et al.*, 1992a, 1992b; YAMADA, 1994; CIRPIANI *et al.*, 2006, 2008, 2009a, 2009b; TANAKA *et al.*, 2010; CORDEIRO *et al.*, 2012). Paralelamente, foi realizado o fracionamento bioquímico de metabólitos secundários com propriedade analgésica, para verificar se outros componentes do jambu, diferentes do espilantol, apresentam este tipo de ação.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Extrair e caracterizar estruturalmente polissacarídeos e metabólitos secundários de *Spilanthes oleracea* L.

1.1.2 Objetivos específicos

- Extrair polissacarídeos de *S. oleracea* por extração aquosa, purificá-los e caracterizá-los;
- Avaliar a atividade antiúlcera gástrica de polissacarídeos purificados;
- Realizar um fracionamento bioguiado de metabólitos secundários da planta, utilizando como parâmetro a atividade antinociceptiva;
- Demonstrar se, além do espilantol, a planta apresenta outros compostos com atividade antinociceptiva.

1.2 Justificativa

Diversas propriedades biológicas já foram descritas para *S. oleracea*, tais como, inseticida, antinociceptiva, anti-inflamatória, antipirética, atividade diurética e antiplasmódica (EKANEM *et al.*, 2007; CHAKRABORTY *et al.*, 2004; CHAKRABORTY *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2008; MBEUNKUI *et al.*, 2011). A propriedade antinociceptiva é a mais estudada e está, na maioria dos estudos, relacionada à presença de alcaloides fixos, principalmente o espilantol. Contudo há relatos de que a planta possua outros compostos que podem apresentar atividade biológica.

Ratnasooriya *et al.* (2004) e Chakraborty *et al.* (2004, 2010) relatam em seus estudos que, além do espilantol, outros metabólitos, como, alcalóides e flavonóides podem estar relacionados aos efeitos diurético, anti-inflamatório e antipirético observados com a administração de extratos da planta em ratos. Porém, não foram encontrados trabalhos na literatura que relacionam a estrutura de outros metabólitos presentes na planta com atividades biológicas. Dessa forma, justifica-se o estudo químico dos metabólitos secundários desta planta.

Com relação aos polissacarídeos, eles podem ser obtidos juntamente com os metabólitos secundários no processo de extração aquosa. Eles são consumidos quando a planta é ingerida como alimento ou na forma de chás. Estes compostos também estão relacionados a diversos efeitos biológicos e, de acordo com a literatura, nada se conhece acerca desse tipo de molécula da planta em questão. Quando a planta é consumida na alimentação ou ingerida como remédio na forma de infusos, além de metabólitos secundários, polissacarídeos também são ingeridos e podem exercer atividades biológicas. Há relatos de vários polissacarídeos de plantas com atividade antiúlcera gástrica (SUN *et al.*, 1992a, 1992b; YAMADA, 1994; CIPRIANI *et al.*, 2006, 2008, 2009a, 2009b; TANAKA *et al.*, 2010; CORDEIRO *et al.*, 2012). Neste trabalho, além da caracterização da estrutura química, foi avaliada a atividade antiúlcera gástrica de um polissacarídeo extraído de *S. oleracea*.

Várias patentes ao redor do mundo já foram solicitadas para a planta em questão, desde a década de 70. As solicitações de patentes demonstram, além da curiosidade científica, o interesse comercial como uma consequência da diversidade de aplicações observadas popularmente. Um estudo químico associado a ensaios biológicos, para a elucidação estrutural de componentes ativos, vem ampliar a

fundamentação científica no que se refere aos usos populares e aplicações observadas para o jambu.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Spilanthes oleracea* L.

A planta *Spilanthes oleracea* L. é conhecida popularmente no Brasil como jambu, jambuaçu, agrião-do-pará, agrião bravo, agrião do Norte, botão de ouro, erva maluca, planta da dor de dente, pimenteira do Pará. Ela possui como sinônimas botânicas *Acmella oleracea* L. (JANSEN, 1985), *Spilanthes acmella* var. *oleracea* (CAVALCANTI, 2008), e *Acmella ciliata* Kunth (VULPI *et al.*, 2007).

O jambú é considerado uma hortaliça doméstica, apresentando relevância na economia familiar de pequenos agricultores dos estados da região Norte do Brasil. O cultivo ocorre nas áreas próximas às residências e é realizado principalmente para o consumo familiar sendo o excedente vendido em feiras de hortaliças. Tem-se atribuído valor econômico, também, como planta ornamental na horticultura, aromatizante de alimento e para fins medicinais (HIND e BIGGS, 2003). Devido ao seu uso popular para fins medicinais e ao crescente interesse da indústria de cosméticos, nos últimos anos a planta vem sendo cultivada nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (CAVALCANTI, 2008).

Os principais usos observados para esta planta na culinária incluem: complemento alimentar em refeições típicas como, tacacá, rabada no tucupi e pato no tucupi, onde é utilizada a planta inteira cozida em tucupi; também pode ser servida em saladas, depois de cozida, ou, raramente, crua. A planta contém uma substância ligeiramente picante que aumenta a salivação quando mastigada.

2.1.1 Descrição botânica

Spilanthes oleracea L. é uma Angiosperma da classe Dicotiledônea, ordem Campanulales (=Syndrae), família Compositae (Asteraceae) (JOLY, 1993), tribo Helianthae e subtribo Ecliptanae (RAMSEWAK *et al.*, 1999). De distribuição cosmopolita, a família Asteraceae é a maior das famílias de dicotiledôneas, representada no Brasil por 300 gêneros e 2000 espécies (SOUSA e LORENZI,

2005). O gênero *Spilanthes* é largamente distribuído ao redor do mundo, em regiões tropicais e subtropicais (RAMSEWAK *et al.*, 1999).

A planta é uma herbácea anual, de 30 a 60 cm de altura, semi-ereta ou quase rasteira, com caule cilíndrico, carnoso e de ramos decumbentes, geralmente sem raízes nos nós (FAVORETO e GILBERT, 2010). Possui raiz principal pivotante, com abundantes ramificações laterais e raízes adventícias no caule e nos ramos que estão em contato com o solo (VILLACHICA *et al.*, 1996). As folhas são simples, com lâmina amplamente ovada de 53 a 106 mm de comprimento e 40 a 79 mm de largura, apresentando pêlos esparsos em ambas as superfícies (HIND e BIGGS, 2003). As flores são pequenas e amareladas, dispostas em capítulos que medem cerca de 1 cm de diâmetro (REVILLA, 2001). A planta floresce durante todo o ano nos trópicos e durante o início do verão em regiões temperadas (HIND e BIGGS, 2003). O fruto é um aquênio de tamanho bem pequeno, com pericarpo cinza escuro, parcialmente cercado por páleas membranosas (VILLACHICA *et al.*, 1996). Algumas das características descritas anteriormente podem ser verificadas na Figura 1.



FIGURA 1 – *Spilanthes oleracea* L.

A planta tem preferência por locais úmidos e cresce bem ao longo das margens de lagos (HIND e BIGGS, 2003). O seu desenvolvimento é melhor em regiões de clima quente e úmido e se multiplica por sementes ou hastes enraizadas (REVILLA, 2001). *S. oleracea* tem distribuição ampla por toda região amazônica e se

adapta bem em clima quente e chuvoso e solo com boa umidade e drenagem (VILLACHICA *et al.*, 1996). Conforme Ramsewak *et al.* (1998), ela pode ser encontrada em pastos úmidos, margens de pântanos, sobre rochas perto do mar e como erva daninha em beiras de estradas.

Jansen (1985) sugeriu que a origem desta espécie seja, provavelmente, o Peru ou o Brasil, mas o cultivo da planta também é naturalizado em algumas áreas na região Oeste da África Tropical. Segundo Villachica *et al.* (1996), a planta é nativa da Amazônia Oriental.

2.1.2 Atividades biológicas relacionadas à *S. oleracea* L.

Para fins medicinais ela é usada como remédio popular para o tratamento de diferentes males. As folhas e inflorescências têm sido utilizadas para o tratamento de males da boca e garganta, tuberculose (LORENZI e MATOS, 2002; VULPI *et al.*, 2007), gripe e tosse, como antibacteriano, antifúngico, antimalárico (RAMSEWAK *et al.*, 1999; FAVORETO e GILBERT, 2010) e como analgésico e anestésico local (TORRES e CHÁVEZ, 2001). Ao colocar a planta na boca há uma leve sensação de dormência e formigamento na língua. Principalmente pela ação de dormência, a inflorescência é muito utilizada como anestésico local em dores de dente (VILLACHICA *et al.*, 1996).

O chá da planta inteira é usado como anti-inflamatório, anti-infeccioso e contra problemas hepáticos. A planta inteira é usada como componente do “lambedor”, um remédio popular que consiste na mistura de várias ervas em água com mel, alho e limão. Nos lambedores, misturada a outras plantas, é indicada para problemas respiratórios como tosse, bronquite, resfriado e gripe. Conforme a crença popular, folhas, ramos, flores e frutos são empregados na elaboração de infusos que servem para combater anemia, dispepsia, sendo indicado também como antiescorbútico (VILLACHICA *et al.*, 1996).

Alguns estudos vêm sendo realizados ao longo dos anos com o objetivo de comprovar a eficácia da planta frente aos seus usos populares. Com base nas pesquisas realizadas até o presente momento acredita-se que *S. oleracea* possua numerosas propriedades medicinais dentre as quais: larvicida, antimicrobiana e

inseticida, devido à presença de compostos bioativos incluindo o espilantol e outras N-isobutilamidas (MBEUNKUI *et al.*, 2011).

O uso como anti-inflamatório e analgésico foi avaliado em um estudo no qual foi testado um extrato aquoso de *S. oleracea* em ratos, por um modelo de edema de pata induzido por carragenana e indução de dor pela administração de ácido acético. Neste estudo foi observada a supressão do edema de pata e a inibição da dor. Tais atividades foram atribuídas à presença de flavonóides (CHAKRABORTY *et al.*, 2004). Um estudo preliminar do mesmo autor demonstrou atividade anestésica e antipirética do extrato aquoso de *S. oleracea*, tendo os efeitos sido atribuídos a alcanidas e flavonóides, respectivamente (CHAKRABORTY *et al.*, 2010). A atividade anti-inflamatória foi avaliada também sobre macrófagos murinos tratados com um extrato obtido por ensaio bioguiado, no qual foi demonstrada a presença de uma alcanida fixa conhecida com o espilantol (WU *et al.*, 2008). A fração contendo a alcanida foi capaz de inibir a expressão de mediadores pró-inflamatórios. Neste mesmo estudo o extrato da planta apresentou também atividade antirradicais livres.

Um extrato aquoso das flores de *S. oleracea* apresentou atividade diurética por induzir diurese em intensidade similar a da furosemida, acompanhada por um aumento nos níveis de sódio e potássio, além de leve acidificação da urina. A partir deste estudo foi sugerido que o extrato atua como um diurético de alça, sendo este efeito atribuído à presença de alcalóides (RATNASOORIYA *et al.*, 2004).

Um estudo acerca do efeito de produtos vegetais e seus constituintes sobre a atividade do complexo enzimático citocromo P450_{2E1} humano, avaliou um extrato etanólico de *S. acmella*, demonstrando uma inibição modesta da atividade do complexo (RANER *et al.*, 2007).

Em outro estudo, o extrato etanólico de flores de *S. acmella* reduziu em 40% a atividade da enzima lipase pancreática humana *in vitro*, sugerindo que ele contém um inibidor de lipase com potencial para atuar como um agente para emagrecimento (EKANEM *et al.*, 2007).

Recentemente, a planta tem sido investigada quanto ao seu potencial para o tratamento de malária. Mbeunkui *et al.* (2011) desenvolveram uma metodologia para isolar alcanidas, principalmente o espilantol, das flores desta planta e demonstraram potencial antiplasmodial contra *P. falciparum*.

2.1.3 Composição química da planta

A composição química de vegetais é definida pelas inúmeras reações químicas que compõem o metabolismo desse tipo de organismo. O metabolismo de vegetais é dividido em primário e secundário. Os metabólitos primários são substâncias essenciais à sobrevivência das células, como as proteínas, lipídios, carboidratos e ácido nucléicos (SIMÕES *et al.*, 2003). No metabolismo secundário, encontram-se substâncias que não estão diretamente relacionadas à manutenção da vida da planta, mas garantem vantagens para a sua sobrevivência.

A planta *S. oleracea* pode ser uma fonte de ácidos graxos essenciais, uma vez que a composição de ácidos graxos dos óleos fixos desta planta, identificados por GC, apresentou um ácido graxo ômega-6 insaturado: ácido linoléico na proporção de 56,37% (PHRUTIVORAPONGKUL *et al.*, 2008). Vulpi *et al.* (2007) extraíram e analisaram os óleos essenciais de caules, folhas e inflorescências e apresentaram como principais componentes em óleos: 3-trideceno, isoeugenol e germacreno-D (caule); germacreno-D, farneseno, 3-trideceno (folhas) e 3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno, espilantol, farneseno (inflorescências).

A composição físico-química de 100 g de folhas frescas de *S. oleracea* apresenta: 89 g de água, 1,9 g de proteínas, 0,3 g de lipídeos, 7,2 g de carboidratos, 1,3 g de fibras, 1,6 g de cinzas, 162,0 mg de cálcio, 41,0 mg de fósforo, 4,0 mg de ferro, 0,03 mg de vitamina B₁, 0,21 mg de vitamina B₂, 20,0 mg de Vitamina C e colina (REVILLA, 2001; FAVORETO e GILBERT, 2010).

Com relação a carboidratos, não há trabalhos relatando estudos referentes a estrutura química deste tipo de composto (oligossacarídeos e polissacarídeos) da planta *S. oleracea* L. E, além do espilantol e outras alcanoidas, nada se conhece sobre estrutura de outros metabólitos secundários presentes na planta.

2.2 Carboidratos de plantas

Os carboidratos são constituintes essenciais de todos os organismos vivos, apresentando funções variadas (SIMÕES *et al.*, 2003). Nas plantas, eles podem existir como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados,

compondo um importante grupo de metabólitos de vegetais, sendo, depois da água seus principais constituintes químicos. De acordo com a sua função, os carboidratos de plantas podem ser classificados em dois grandes grupos: estruturais e de reserva.

Dentre os carboidratos de reserva observa-se a presença de monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos e seus derivados, dentre os quais podem ser citados o amido, sacarose, frutanas, galactomananas e outros. Os carboidratos estruturais são responsáveis pela formação da parede celular e de outras estruturas na planta, sendo considerados os compostos mais abundantes da Terra (REID, 1997).

2.2.1 Parede celular de vegetais e polissacarídeos

A parede celular vegetal é um envoltório presente em todas as células de vegetais superiores, salvo raras exceções (REID, 1997). A importância da parede celular pode ser percebida quando se considera as diversas funções que ela desempenha, na determinação da forma das células vegetais, textura do tecido e morfologia do vegetal, pela força mecânica e rigidez que apresenta (REID, 1997). Ela ainda apresenta função na comunicação célula-célula, controla o crescimento celular, protege a célula do ataque de patógenos e predadores (BRETT e WALDRON, 1990).

A parede celular de vegetais é composta majoritariamente de carboidratos que estão associados a proteínas (HELDT, 1997), podendo apresentar muitos polissacarídeos diferentes e, também, substâncias aromáticas. Este envoltório celular apresenta um complexo grau de estruturação, além de ser um compartimento dinâmico que passa por mudanças ao longo da vida da célula. A fração glicídica consiste em microfibrilas de celulose entrelaçadas em uma fase contínua de pectina e hemicelulose, além da lignina em paredes celulares secundárias (WHISTLER, 1970). As paredes de células adjacentes se encontram numa linha divisória chamada lamela média, que confere forte aderência célula-célula (REID, 1997). A parede celular encontra-se dividida em primária, não lignificada, e secundária, lignificada.

A parede celular primária, encontrada em células jovens, que mantém a capacidade de divisão e alongamento, apresenta importância no processo de expansão celular (REID, 1997). A composição química da parede celular primária de dicotiledôneas é de, aproximadamente, 25-40% de celulose, 15-25% de hemicelulose, 15-40% de substâncias pécicas, 5-10% de proteínas e traços de compostos fenólicos (AVIGAD e DEY, 1997). A parede celular secundária encontra-se entre a membrana plasmática e a parede celular primária e confere rigidez aos tecidos vegetais (REID, 1997). Quando as células com parede celular primária perdem a capacidade de crescimento e divisão, ocorre a conversão da parede primária em secundária. A constituição química deste tipo de parede em dicotiledôneas é de, aproximadamente, 40-45% celulose, 15-35% hemiceluloses, 15-30% lignina e traços de pectinas (AVIGAD e DEY, 1997).

As pectinas, celulose e hemiceluloses, que compõem a parede celular dos vegetais, podem ser classificadas de acordo com o modo de extração. As pectinas são extraídas por soluções aquosas de oxalato de amônio ou EDTA, que são capazes de quelar o cálcio ou outros cátions metálicos divalentes presentes entre grupamentos carboxílicos carregados negativamente e que fazem uma ponte de ligação entre moléculas pécicas, chamada zona de junção. As hemiceluloses são mais difíceis de serem removidas da parede celular, requerendo o uso de soluções alcalinas. A celulose é obtida a partir dos resíduos da extração de pectinas e hemiceluloses, não sendo solúvel em álcali (AVIGAD e DEY, 1997).

As pectinas são polissacarídeos complexos contendo unidades de ácido galacturônico, sendo ricas em ramnose, arabinose e galactose. O termo pectina refere-se a polissacarídeos complexos que contém unidades de ácido α -D-galacturônico (GalpA) compreendendo três classes de polímeros: homogalacturonanas, ramnogalacturonas do tipo I (RG I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG II). Arabinanas, galactanas e arabinogalactanas são frequentemente encontradas em frações pécicas como cadeias laterais das RG I (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990).

As homogalacturonanas são polissacarídeos que apresentam uma cadeia linear constituída por unidades de ácido α -D-galacturônico, unidas por ligações do tipo 1 \rightarrow 4, com alguns grupamentos carboxílicos metil-esterificados (O'NEILL *et al.*, 1990),

As ramnoglacturonanas do tipo I (RG I) são heteropolímeros que apresentam cadeia principal constituída por repetições do grupo dissacarídico [$\rightarrow 4$)- α -D-GalpA-($1 \rightarrow 2$)- α -L-Rhap-) $1 \rightarrow$]. As unidades de ramnose podem apresentar ramificações em seu O-4. Os substituintes podem ser cadeias de arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas (McNEILL *et al.*, 1994; REID, 1997). A grande diversidade de cadeias laterais nas RG I gera moléculas de alta complexidade e de difícil caracterização. Além disso, alguns estudos identificam a presença de grupamentos O-acetil substituindo os C-2 ou C-3 das unidades de ácido α -D-galacturônico em RG I (LEROUGE *et al.*, 1993).

O terceiro grupo de polissacarídeos pécticos são as galacturonanas altamente substituídas que se apresentam como um grupo diverso de polissacarídeos com uma cadeia principal constituída por unidades de ácido α -D-galacturônico unidas por ligação do tipo $1 \rightarrow 4$ (O'NEILL *et al.*, 1990). As ramnoglacturonanas do tipo II (RG II) estão inseridas nesse grupo de pectinas. Elas apresentam cadeias laterais geralmente substituídas em C-2 das unidades de α -D-GalpA e seus substituintes são formados por oligossacarídeos contendo monossacarídeos raros como apiose, 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose, ácido acérico, entre outros, formando estruturas altamente complexas (CARPITA e GIBEAUT, 1993; REID, 1997).

As hemiceluloses ocorrem juntamente com a celulose. As unidades monossacarídicas que as constituem são D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, ácido 4-O-metilglucurônico, ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico, eventualmente apresentando grupamentos O-acetil ligados às unidades pertencentes às cadeias principal e/ou lateral (FENGEL e WEGNER, 1989). Estes monossacarídeos constituem diferentes polissacarídeos que podem ser incluídos nas classes arabinogalactanas, arabinoxilanas, xilanas, galactoglucomananas, glucuronoxilanas, glucomananas, mananas e xiloglucanas (PULS e SCHUSEIL, 1993; KACURÁCOVÁ *et al.*, 2000), galactomananas, glucuronomananas, calose (β -glucanas com ligação $1 \rightarrow 3$), β -glucanas ($1 \rightarrow 3$), ($1 \rightarrow 4$) ligadas e arabinogalactanas do tipo II (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990).

Carpita e Gibeaut (1993) propuseram um modelo estrutural para a parede celular primária de dicotiledôneas, denominadas paredes tipo I (Figura 2). Neste tipo de parede as microfibrilas de celulose estão entrelaçadas por xiloglucanas e esta

estrutura está embutida em uma matriz de polissacarídeos pécticos: ácido poligalacturônico e ramnoglacturonanas.

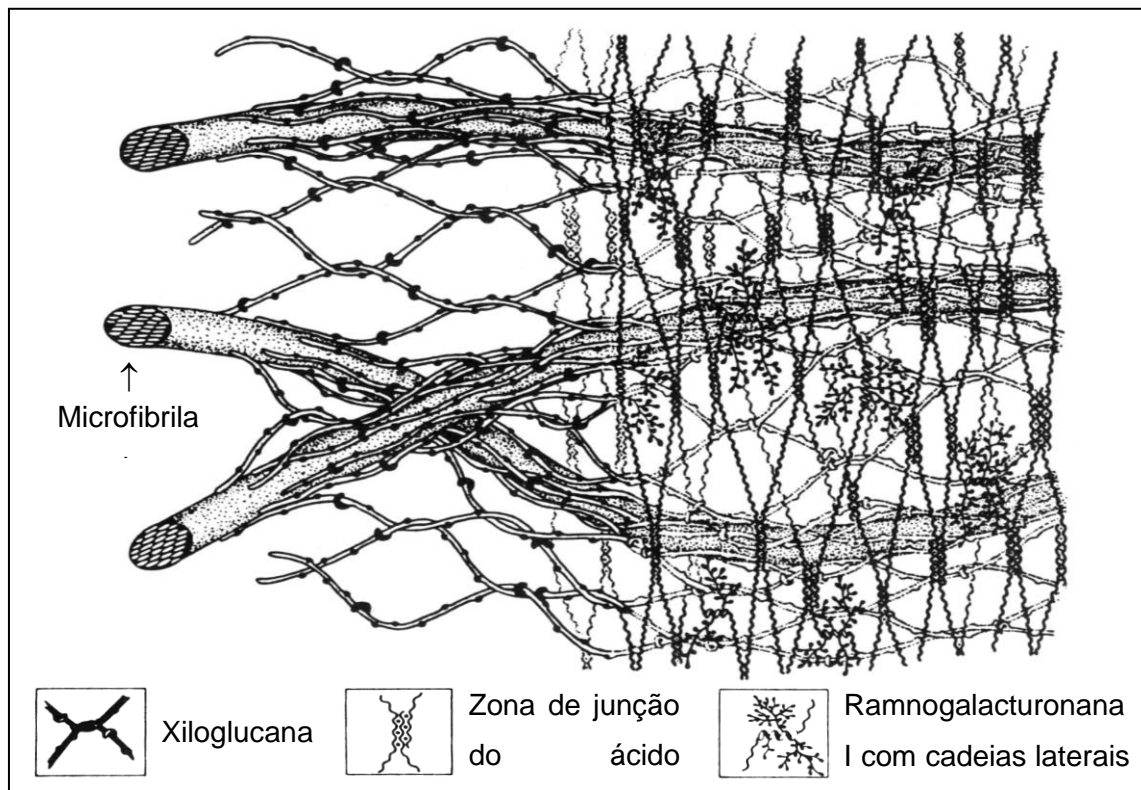


FIGURA 2 – Modelo da estrutura da parede celular primária de dicotiledôneas (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

2.2.1.1 Ramnoglacturonanas do tipo I

As ramnoglacturonanas do tipo I (RG I) são heteropolímeros que contêm a cadeia principal constituída por unidades de ácido α -D-galacturônico ligadas em O-4 e unidades de α -L-ramnose ligadas em O-2. As RG I podem ser estendidas por ácido poligalacturônico em seus terminais e as unidades ramnosil podem interromper longos períodos de ácido poligalacturônico (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Geralmente as unidades de ácido α -D-GalpA não apresentam substituições. As unidades de ramnose podem servir como pontos de ramificação da estrutura principal. Em proporções variadas as unidades de α -L-Rhap (20 a 80 %) podem se apresentar substituídas em O-4 por diversos tipos de cadeias laterais (O'NEILL *et al.*, 1990). A quantidade de resíduos de ramnose contendo cadeias laterais pode variar conforme o tipo celular e o estado fisiológico da planta. Como consequência da frequência variável de unidades de ramnose nas RG I existem estruturas mais ramificadas que outras, podendo gerar moléculas de alta complexidade. As cadeias laterais desse tipo de polímero são constituídas principalmente por unidades de açúcares neutros. Os três principais tipos de cadeias laterais das RG I conhecidas são as arabinanas, as galactanas e as arabinogalactanas (McNEIL *et al.*, 1984; KOMALAVILAS e MORT, 1989). Além disso, um terço das unidades de ácido galacturônico são acetiladas na posição O-3 (KOMALAVILAS e MORT, 1989). Lerouge *et al.* (1993) localizaram grupos acetil no O-2 ou O-3 dos resíduos de ácido galacturônico de RG I.

2.2.1.2 Arabinogalactanas

As arabinogalactanas são polissacarídeos estruturais presentes na maioria dos vegetais superiores (FINCHER *et al.*, 1983). Elas apresentam uma estrutura molecular altamente complexa e de difícil caracterização (WHISTLER, 1970; ASPINAL, 1982). Estes polímeros podem estar presentes em diversas estruturas dos vegetais, já tendo sido isolados a partir de folhas, caules, raízes, flores, sementes, gomas e exsudatos (FINCHER *et al.*, 1983; MENESTRINA *et al.*, 1998; DELGOBO *et al.*, 1998, 1999; CIPRIANI *et al.*, 2006; MELLINGER *et al.*, 2005).

Baseado nas diferenças relacionadas às ligações químicas envolvidas na formação da cadeia principal destas macromoléculas, Aspinall (1973) classificou as arabinogalactanas em dois grandes grupos: arabinogalactanas do tipo I (AG I) e do tipo II (AG II).

As AG I apresentam cadeia principal constituída por unidades de β -D-galactose (1 \rightarrow 4) ligadas, são pouco ramificadas, sendo encontradas somente em frações pécticas, geralmente associadas às RG I. Na maioria das vezes, apresentam

unidades de arabinose ligadas no O-3 das unidades de galactose da cadeia principal (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

As AG II são altamente ramificadas, constituídas por cadeias principais de (1→3) e/ou (1→6) β-D-galactanas conectadas umas as outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6. Elas possuem a maior parte das posições O-3 e O-6 restantes ocupadas por unidades de arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Estas macromoléculas podem estar ramificando ou não as RG I (STEPHEN, 1983).

2.2.2 Atividades biológicas de polissacarídeos de plantas

Os carboidratos de plantas e de diversas outras fontes têm demonstrado várias atividades biológicas, dentre as quais, antiviral, antitumoral, imunoestimulante, anti-inflamatória, anticomplemento, anticoagulante, hipoglicemiante e antiúlcera gástrica (SRIVASTAVA e ULSHVESHATHA, 1989; CAPEK *et al.*, 2003; YAMADA, 1994; NERGARD *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2006). Além destas atividades a literatura também relata atividade leishmanicida (NOLETO *et al.*, 2002), antitussígena (EBRINGEROVÁ *et al.*, 1998; KARDOSOVÁ *et al.*, 2004) e reguladora intestinal (SANZ *et al.*, 2005; NEWBURG, RUIZ-PALACIOS e MORROW, 2005; MARLETT e FISHER, 2003). Desta maneira, eles são considerados uma importante classe de produtos naturais bioativos (SIMÕES *et al.*, 2003).

Vários estudos realizados com diversos polissacarídeos, de diferentes fontes naturais, têm destacado glucanas, mananas, galactomananas e arabinogalactanas como promissores agentes capazes de exercer respostas biológicas.

2.2.3 Atividade antiúlcera gástrica de polissacarídeos

A atividade antiúlcera gástrica tem sido atribuída a vários polissacarídeos. Ela foi verificada para polissacarídeos pécticos, contendo altos teores de ácido galacturônico, purificados das plantas *Panax ginseng* (SUN *et al.*, 1992), *Bupleurum falcatum* (YAMADA, 1994) e *Maytenus ilicifolia* (CIPRIANI *et al.*, 2009a).

Heteroxilanas ácidas de *Maytenus ilicifolia* e *Phyllanthus niruri* (CIPRIANI *et al.*, 2008), arabinogalactanas isoladas de *Maytenus ilicifolia* (CIPRIANI *et al.*, 2006), *Glycine max* (CIPRIANI *et al.*, 2009b), *Cereus peruvianus* (TANAKA *et al.*, 2010), e uma arabinana associada a polissacarídeos pécticos de *Chenopodium quinoa* (CORDEIRO *et al.*, 2012), também apresentaram efeito antiúlcera gástrica. Muitos outros trabalhos apenas atribuíram a atividade antiúlcera gástrica a polissacarídeos presentes em extratos brutos, não avaliando o efeito dos polímeros purificados (CHO *et al.*, 2000; YE *et al.*, 2003; NERGARD *et al.*, 2005; SANMUGAPRIYA e VENKATARAMN, 2007).

Os mecanismos do efeito gastroprotetor de polissacarídeos possivelmente estão relacionados à habilidade destes polímeros de formarem uma camada protetora sobre a mucosa gástrica; à atividade antissecretora de suco gástrico; ao aumento da síntese de muco e ao sequestro de radicais livres (NERGARD *et al.*, 2005; YAMADA, 1994; MATSUMOTO *et al.*, 1993; CIPRIANI *et al.*, 2006).

2.3 Metabólitos secundários de plantas

Produtos do metabolismo secundário não são essenciais para o organismo produtor, por não apresentarem uma função vital. Esse tipo de composto costuma atribuir vantagens para a sobrevivência da planta e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema (SIMÕES *et al.*, 2003). Os metabólitos secundários não têm uma função óbvia no metabolismo primário do vegetal, podendo apresentar um papel ecológico como atrativo de polinizadores, defesa contra herbívoros e patógenos, defesa química contra predadores maiores e resposta protetora para o estresse abiótico (LOPEZ-BUCIO *et al.*, 2006). Os alcalóides e os flavonóides são exemplos de metabólitos secundários de plantas e estão entre os mais estudados. Com relação a planta *S. oleracea* existem trabalhos que atribuem a esses tipos de metabólitos atividades biológicas (CHAKRABORTY *et al.*, 2004; RATNASOORIYA *et al.*, 2004; CHAKRABORTY *et al.*, 2010), sem, no entanto, caracterizá-los estruturalmente. Existem alguns estudos referentes à estrutura e atividade de alcanidas fixas, principalmente o espilantol (MOLINA-TORRES *et al.*, 1999; LEY *et al.*, 2006; FAVORETO e GILBERT, 2010), que são os metabólitos secundários mais associados à maioria das atividades biológicas já observadas para esta planta.

2.3.1 Alcamidas

As alcamidas constituem um grupo de metabólitos secundários comum a várias plantas, sendo aquelas da família Asteraceae as principais produtoras destes compostos, contendo derivados acetilênicos e olefinícos (GREGER, 1984). As alcamidas já foram encontradas em 10 famílias de plantas, dentre elas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Rutaceae, Poaceae, e Solanaceae. Contudo, as famílias Asteraceae, Piperaceae e Rutaceae são conhecidas por conterem os níveis mais altos observados. Conforme Molina-Torres e Chaves (2001), as espécies produtoras de alcamidas mais importantes são: *Heliopsis longipes*, que foi a primeira planta de onde se extraíram alcamidas, *Acmella radicans*, *Echinacea purpúrea*, *Achillea millefolium*, *Zanthoxylum piperifum* e *Capsicum annum*.

Nas alcamidas, ou alquilamidas, diferentes aminas são combinadas com ácidos graxos insaturados por uma ligação amida. As aminas provavelmente são originadas de aminoácidos por descarboxilação e o ácido graxo insaturado pode conter uma cadeia alquila com 9 a 18 átomos de carbono (GREGER, 1984). Dependendo do número de insaturações na cadeia, as alcamidas podem ser divididas em dois grupos: alcamidas olefinicas, que possuem somente ligações duplas, e acetilênicas, com pelo menos uma ligação tripla (MOLINA-TORRES e CHAVEZ, 2001).

O crescente interesse nas alcamidas se deve aos diversos tipos de atividades biológicas, como atividade anti-inflamatória (WU *et al.*, 2008) e anestésica local que podem ser observadas pela administração destas, mesmo em pequenas quantidades. Esse tipo de molécula pode apresentar respostas notáveis em células receptoras, tendo as alcamidas alifáticas demonstrado eficácia como compostos medicinais (MOLINA-TORRES e CHAVES, 2001).

A alcamida mais conhecida da planta *S. oleracea*, responsável por várias atividades biológicas, é o espilantol [(N-2-metilpropil)-2,6,8-decatrienamida ou N-isobutil-2E6Z8E-decatrienamida)], uma alcamida olefínica, com estrutura química idêntica a da afinina (Figura 2), isolada de *Heliopses longipes* (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992). Esta alcamida é abundante nos capítulos florais de *S. oleracea* (FAVORETO e GILBERT, 2010) e possui fórmula molecular C₁₄H₂₃NO. De maneira geral, ao espilantol tem-se atribuído o efeito sensorial de anestesia e formigamento

observado para a planta. Ley *et al.* (2006) demonstraram relação entre a estrutura das alcanidas, com a atividade sensorial de formigamento e dormência.

O espilantol foi descrito como um óleo viscoso, ardente, de coloração amarela pálida a amarela clara (CAVALCANTI, 2008). As seguintes propriedades físicas do espilantol são relatadas: massa molecular de 221 g/mol; ponto de fusão de 23 °C; ponto de ebulição de 165 °C; índice de refração a 25 °C de 1,5135; absorção máxima em 228,5 nm (JACOBSON, 1957).

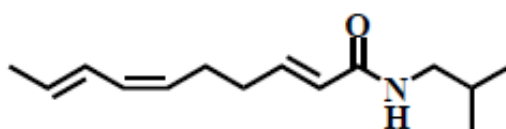


FIGURA 3 – Estrutura química do espilantol (PHRUTIVORAPONGKUL,

Pesquisas em busca de inseticidas de origem natural, que foram iniciadas nos Estados Unidos após a segunda Guerra, despertaram o interesse pelas alcanidas extraídas de vegetais (NIGRINIS *et al.*, 1986). Em outras espécies do gênero *Spilanthus*, o espilantol foi identificado como sendo o principal composto ativo presente (MOLINA-TORRES *et al.*, 1999).

Borges-del-Castillo *et al.* (1984) realizaram o isolamento e a caracterização da alcanida N-2-feniletilcinamamida de *S. ocyimifolia*. Nigrinis *et al.* (1986) apresentam, além da alcanida olefinica espilantol, a alcanida acetilênica N-isobutyl-deca-5-ino-8-eno-trans amida, presentes nas flores de *S. americana* (Mutis). As estruturas de quatro alcanidas pungentes foram estabelecidas por métodos espectroscópicos de um extrato hexânico das flores de *S. acmella*: espilantol, (2-N-(2-metilbutil)-2undecene-8,10-dinamida, (2E,7Z)-N-isobutyl-2,7-tridecadienamide-10,12-dynamide e (7Z)-N-isobutyl-7-tridecene10,12-dynamide (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992). Três isobutilamidas, espilantol, undeca-2E,7Z,9E-ácido trienóico e undeca-2E-em-8,10-ácido dienóico, foram caracterizadas estruturalmente por métodos espectroscópicos, a partir de um extrato hexânico de inflorescências de *S. acmella*, tendo demonstrado atividade larvica contra *Aedes aegypti* e mosquitocida contra neonatos de *Helicoverpa zea* (RAMSEWAK *et al.*, 1999).

Phrutivorapongkul *et al.* (2008), descreveram o isolamento de (2E,4E,8Z,10E)-N-isobutyl-2,4,8,10-dodecatraenamida, uma alcamida anestésica como o espilantol, obtida de *Acmella oleracea* L.. Molina-Torres (1999), verificaram que o espilantol, obtido a partir das raízes da planta *Heliopsis longipes*, inibe o crescimento de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4 Patentes envolvendo o jambu

O interesse comercial pela planta é evidente, haja vista as várias patentes solicitadas ao redor do mundo para produtos contendo a planta inteira, partes da planta, ou extratos, que vão desde cosméticos a flavorizantes de alimentos. Algumas das patentes expressam a presença do espilantol nos extratos da planta ou a obtenção de espilantol puro para participação em produtos elaborados.

Várias patentes contendo o extrato de *S. oleracea*, relacionando a presença de espilantol, foram solicitadas por indústrias japonesas para utilização como aditivo para alimentos e bebidas (HAUS SHOKUJIN KOGYO Co. Lt., 1970); agente de limpeza em preparações para o corpo e cabelos (TAKASAGO PERFUMERY Co. Lt., 1992); uso como produto inseticida, para o controle de insetos e microorganismos em plantas (NATURAL PROD. KK, 2002). Neste último caso o produto patenteado consiste em uma mistura de várias plantas, incluindo *S. oleracea*. Na China foi solicitada uma patente para um remédio oriental composto por várias plantas, inclusive *S. oleracea*, para utilização no tratamento de resfriados comuns e gripes (FANG, L., 1993).

A empresa Ballal BB solicitou a patente de um produto fitoterápico contra infecção por HIV e tratamento de AIDS, obtido a partir do pó da raiz de *S. oleracea* (BALLAL, BB., 2006). A empresa Fortune Star requer a patente de uma composição a base de ervas, inclusive *S. oleracea* com atividade fungicida (FORTUNE STAR INVESTMENT CORP., 2009). Uma composição contendo uma mistura de várias plantas, com atividade antibacteriana e antimicrobiana, foi patenteada pela empresa Euro Natural Prod. (ADLER, R.J. e ADLER, R., 2004).

Na categoria de produtos cosméticos várias patentes tem sido requeridas nos últimos anos. A empresa Dermane & Passaro descreve um produto para o

tratamento cosmético antirrugas a base de espilantol puro ou extrato de *S. oleracea* contendo espilantol, com capacidade de inibir a contração de músculos subcutâneos, principalmente da face (DERMANE, F. e PASSARO, G., 2006). A empresa Ikeda Bussa Co Ltd. requer a patente de preparações cosméticas para o corpo e rosto a partir do extrato da raiz de *S oleracea*, com atividade para redução das rugas e antienvelhecimento da pele (IKEDA, T., 2007). A patente US2008/0069912 trata do uso de um extrato da planta para efeito botox em uma composição cosmética antirrugas (DERMANE, F. R. e PASSARO, G., 2008).

A Natura Cosméticos S.A. reivindica um processo de preparação de extrato de jambú livre de clorofila e seu uso em composições cosméticas (DELARCINA et al., 2006). Na patente sob número PI0802053-3, a Natura, em parceria com a UFBA e a UNICAMP, registrou um processo de extração, por meio da tecnologia de fluido supercrítico, de compostos ativos de material vegetal, tendo como objetivo principal a obtenção de espilantol e outras alcanidas a partir de *S oleracea* (CRUZ et al., 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material de estudo

A planta foi coletada no estado do Acre, no município de Cruzeiro do Sul, região do Alto Juruá, extremo Oeste da Amazônia Legal. A identificação foi realizada pela MSc. Rosângela de Araújo Pereira Holanda e Souza, curadora do Herbário da Universidade Federal do Acre – Parque Zoobotânico (UFAC-PZ), onde se encontra depositado um exemplar da planta sob registro nº 15099.

Parte do material coletado foi seco sem haver separação de ramos, folhas e flores e uma parte sofreu separação dos ramos, flores e folhas. Planta inteira e apenas folhas foram secas em estufa a 50 °C por aproximadamente 2 dias.

3.2 Deslipidificação e despigmentação do material de estudo

A planta inteira (221,4 g) e as folhas (46,7 g) foram deslipidificadas e despigmentadas com clorofórmio:metanol (2:1, v/v) em extrator soxhlet. O extrato clorofórmio:metanólico foi concentrado e liofilizado.

3.3 Extração de polissacarídeos

3.3.1 Obtenção de polissacarídeos por extração aquosa

Os resíduos secos resultantes do processo de despigmentação e deslipidificação da planta inteira (194,4 g) e das folhas (40,8 g) foram submetidos à extração aquosa a quente.

Para a extração de polissacarídeos da planta inteira, o material e mais 2 litros de água destilada foram adicionados em um béquer, que permaneceu em banho-maria fervente, com agitação mecânica constante. Após 3 horas, o extrato foi filtrado e o resíduo submetido a mais um ciclo de extração aquosa.

Para a extração de polissacarídeos das folhas, o material e mais 500 ml de água destilada foram adicionados em um balão. O processo de extração foi realizado sob refluxo. Após 3 horas, o extrato foi filtrado e o resíduo submetido a mais um ciclo de extração aquosa.

Os extratos aquosos da planta inteira e das folhas foram concentrados em rotaevaporador até pequeno volume, tratados com etanol (3 volumes) e centrifugados a fim de separar o precipitado (polissacarídeos e proteínas) do sobrenadante (moléculas de baixa massa molar). Os materiais precipitados em etanol foram dialisados em membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa e, então, liofilizados. Os sobrenadantes etanólicos foram concentrados por rotaevaporação e liofilizados.

3.4 Purificação dos polissacarídeos

3.4.1 Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo

Os extratos contendo polissacarídeos (planta inteira e folhas) foram submetidos a congelamento e posterior descongelamento a temperatura ambiente. O precipitado, insolúvel em água fria, foi separado do sobrenadante por centrifugação (8.000 rpm / 15 min a 10 °C). Este processo foi repetido até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado após congelamento e descongelamento. As frações solúveis em água fria (sobrenadante de congelamento e degelo) e insolúveis em água fria (precipitado de congelamento e degelo) foram concentradas e liofilizadas.

3.4.2 Fracionamento dos polissacarídeos por variação do pH do meio

As frações submetidas a este processo foram solubilizadas em água destilada (200 mL) e em seguida, 2 mL de ácido acético foram adicionados (pH do meio ~3,0) e o precipitado obtido foi separado do sobrenadante por centrifugação (8.000 rpm / 15 min a 20 °C). As frações solúvel e insolúvel em pH ácido foram dialisadas em

membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa, então concentradas em rotaevaporador e liofilizadas.

A fração solúvel em pH ácido, obtida a partir das folhas de *S. oleracea* foi, após ser separada por centrifugação, ultrafiltrada através de uma membrana com poros de 0,22 μm (membrana de éster de celulose, Millipore). Este procedimento foi realizado para eliminar um fino resíduo que não sedimentava por centrifugação.

3.4.3 Tratamento com α -amilase

A fração solúvel em ácido acético, proveniente da extração aquosa da planta inteira (PSC), em uma concentração de 10 mg/mL foi tratado com α -amilase de *Bacillus licheniformis* (SIGMA). A reação ocorreu com 100 unidades/mL de enzima em tampão fosfato 20 mmol/L, pH 6,9, contendo 6,7 mmol/L de NaCl, a 20 °C por 30 min. Posteriormente, a enzima foi removida por precipitação com TCA 5%, seguida de centrifugação. O sobrenadante, após ser neutralizado, foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa e liofilizado.

3.4.4 Tratamento com dimetilsulfóxido (Me_2SO)

A fração solúvel em pH ácido, proveniente da planta inteira, foi submetida à fervura com Me_2SO por duas horas. A fração solúvel em Me_2SO foi separada da insolúvel por centrifugação a 8.000 rpm, por 15 min a 20 °C. As duas frações resultantes foram dialisadas em membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa, concentradas em rotaevaporador e liofilizadas.

3.4.5 Tratamento com resinas aniônica e catiônica

Uma fração de 120 mg de PSC-SD obtida a partir da planta inteira foi aplicada sobre uma coluna de resina catiônica, e eluída com água destilada e depois com uma solução de NaCl 10%, resultando em duas frações que foram dialisadas

em membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa, então concentradas em rotaevaporador e liofilizadas. A fração eluída em água na resina catiônica foi aplicada sobre uma coluna de resina aniônica e eluída com água e depois foi dialisada, concentrada e liofilizada.

A eluição através das colunas ocorreu com cada um dos solventes até que o teste qualitativo de fenol-ácido sulfúrico se apresentasse negativo para a presença de carboidratos.

3.5 Análise estrutural dos polissacarídeos

3.5.1 Composição monossacarídica

As composições monossacarídicas foram determinadas após a hidrólise de aproximadamente 2 mg dos polissacarídeos com 1 mL de TFA 2 mol/L, a 100 °C em estufa por 8 h. As soluções foram evaporadas até a secura e o resíduo dissolvido em 2 mL de água destilada, sendo que uma pequena fração foi analisada por TLC e ao restante do material foi adicionado NaBH₄ até pH 9,0 e, após 18 h, adicionou-se resina catiônica sob agitação. Com pH do meio ~2,0, a resina foi removida por filtração, o material foi evaporado até a secura e o ácido bórico resultante foi removido como borato de trimetila, por repetidas evaporações com metanol (WOLFROM e THOMPSON, 1963). Os alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v/v; 1 mL), à temperatura ambiente, *overnight*. As reações de acetilação foram interrompidas com gelo e os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio, que foi lavado diversas vezes com solução aquosa de CuSO₄ a 5% para a eliminação da piridina residual. Os acetatos de alditóis foram analisados por GLC e identificados pelos seus tempos de retenção comparados com padrões.

3.5.2 Metilação dos polissacarídeos isolados e análise na forma de acetatos de alditóis

Os polissacarídeos foram metilados pelo método de CIUCANU e KEREK (1984). O polissacarídeo foi solubilizado em Me₂SO (1 mL). Excesso de NaOH triturado e seco foi adicionado à solução, seguido pela adição de CH₃I (1 mL), agitação em vórtex por 30 min e repouso por 24 h. A metilação foi interrompida com água destilada sob banho de gelo e a solução acidificada com ácido acético ou H₂SO₄ diluído. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água destilada. A fase clorofórmica foi evaporada e o material hidrolisado com H₂SO₄ 50% (v/v; 0,5 mL) por 1 h a 0 °C, seguido pela diluição a 5,5% (v/v; adição de 4,0 mL de água destilada) e aquecimento a 100 °C por 17 h (SAEMAN *et al.*, 1954), ou hidrolisado com ácido fórmico 45% (1 mL) a 100 °C por 17 h. O material hidrolisado com H₂SO₄ foi neutralizado com BaCO₃, filtrado, reduzido com NaBD₄ e acetilado (item 3.5.1). Quando ácido fórmico foi utilizado para a hidrólise, ele foi evaporado antes da adição de NaBD₄. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976; SASSAKI *et al.*, 2005).

3.5.3 Carboxirredução

O processo de carboxirredução foi realizado segundo TAYLOR e CONRAD (1972), que consiste na reação de ácidos carboxílicos com carbodiimidas, gerando ésteres que podem ser reduzidos na presença de NaBH₄. Neste caso, as unidades de ácidos urônicos de um polissacarídeo são convertidas no seu açúcar neutro correspondente.

O polissacarídeo foi dissolvido em tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanosulfônico] (0,2 mol/L, pH 4,75, 10 mL) e a este foi adicionado, pouco a pouco e sob agitação, 24 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida] para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A mistura de reação permaneceu sob agitação por duas horas. Em seguida, foi adicionado tampão TRIS (2 mol/L, pH 7,0) até pH 7,0 (5 mL) e, posteriormente, NaBH₄ para uma concentração final de 2 mol/L (1,13 g). Durante a adição do NaBH₄, o pH do meio foi controlado em 7,0 pela adição de HCl diluído e, a formação de espuma foi evitada pela adição de algumas gotas de octanol. Após 14 h, a redução foi interrompida pela adição de ácido acético

até pH 5,0. O material foi dialisado em membrana com limite de exclusão de 6-8 kDa, concentrado e liofilizado.

3.6 Teste de homogeneidade e determinação da massa molar

Os ensaios de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizados no aparelho da Wyatt Technology, equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC), com quatro colunas de gel permeação em série, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ Da, um detector de índice de refração modelo Waters 2410, e um detector de espalhamento de *laser* multiângulo (MALLS) a 632,8 nm modelo Dawn DSP, que promove a leitura do espalhamento de luz, que é captado em diferentes intensidades por detectores em diferentes ângulos. Como eluente, foi usada uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 0,2 g/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min. As amostras foram solubilizadas na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL, e filtradas através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,22 μm . Uma quantidade de 200 μL de cada amostra foi injetada e os resultados foram obtidos com o *software* ASTRA 4.70.07.

A determinação da massa molar foi realizada após a obtenção da taxa de variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc) do polissacarídeo purificado, uma vez que essa é uma característica específica de cada molécula. A amostra foi solubilizada na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL, e filtrada através de membrana de acetato de celulose (MILLIPORE) com diâmetro médio dos poros de 0,45 μm . A amostra foi diluída para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL e analisada utilizando-se apenas o detector de índice de refração, com as colunas desacopladas. O fluxo do solvente foi de 0,1 mL/min, uma quantidade de 200 μL de amostra foi injetada no equipamento e os resultados foram obtidos com o *software* ASTRA 4.70.07.

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Cromatografia em camada delgada (TLC)

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para verificar a composição monossacarídica e presença de ácidos urônicos das frações de polissacarídeos hidrolisados e, também, para avaliar os metabólitos de baixa massa molar presentes nas frações obtidas a partir do sobrenadante etanólico da extração aquosa.

As análises foram realizadas em placas de sílica gel 60G (MERCK) com 8 cm de altura total. Para a análise de carboidratos a fase móvel utilizada foi uma mistura de acetato de etila:ácido acético:*n*-propanol:água (4:2:2:1, v/v) ou *n*-propanol:água (7:3 v/v) e o revelador utilizado foi orcinol:H₂SO₄ (0,2 g de orcinol, em 95 mL de etanol e 5 mL de H₂SO₄) (SASSAKI *et al.*, 2008). Para a análise dos metabólitos de baixa massa molar, diversos sistemas de solvente foram utilizados como fase móvel. Para a separação de oligossacarídeos e/ou glicosídeos foi utilizada como fase móvel uma mistura de *n*-propanol:água (6:2, v/v) contendo 0,5% de ácido acético e, para a separação de aminoácidos foi utilizada a mistura de acetato de etila:ácido acético:*n*-propanol:água (4:2:2:1, v/v). Para a visualização dos metabólitos contendo carboidrato foi utilizado o revelador orcinol:H₂SO₄ e para a visualização de aminoácidos foi utilizada solução alcóolica de ninhidrina (0,2 g/100 mL de etanol).

3.7.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas foi realizada em cromatógrafo Varian Saturn 2000R – 3800 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 2000R, utilizando a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 mL/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis foram analisados a uma temperatura de 50 – 220 °C (40 °C/min) e os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados a uma temperatura de 50 – 215 °C (40 °C/min).

3.7.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance-DRX-400 MHz, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram analisadas em uma sonda invertida de 5 mm de diâmetro, nas temperaturas de 50 °C ou 70 °C. Os polissacarídeos foram solubilizados em D₂O ou Me₂SO-*d*₆. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e acetona (δ 30,2) ou Me₂SO-*d*₆ (δ 39,5) foram utilizados como padrões internos. Foram realizadas análises de RMN-¹³C, DEPT-135 e experimentos de RMN-2D (HSQC e HMBC).

3.7.4 Dosagem de ácidos urônicos

A determinação de ácidos urônicos foi realizada segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). A 400 μ L de amostra foram adicionados 40 μ L de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 mol/L (pH 1,6) e, em seguida, 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mmol/L em H₂SO₄). A solução foi agitada em vórtex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após o resfriamento dos tubos em banho de gelo, foram adicionados 80 μ L de meta-hidroxibifenila (0,15%, p/v, em NaOH 0,5%, p/v) e os tubos foram agitados novamente em vórtex. A presença de ácidos urônicos foi visualizada pelo aparecimento de uma coloração rósea. A sensibilidade do método é de 0,97-38,8 μ g de ácido urônico em 400 μ L de amostra, com leitura em 525 nm. O ácido galacturônico foi utilizado como padrão por ser o mais comumente encontrado em polissacarídeos de plantas.

3.8 Fracionamento bioguiado de compostos de baixa massa molar

3.8.1 Partição líquido-líquido do sobrenadante etanólico da extração aquosa

O sobrenadante etanólico da extração aquosa (20 g) foi solubilizado em 50 mL de água destilada e particionado (1:1, v/v) com os seguintes solventes em

sequência: clorofórmio, acetato de etila e butanol. O procedimento de partição rendeu quatro frações, que foram submetidas a testes de atividade antinociceptiva.

3.8.2 Fracionamento em coluna de sílica gel

A fração aquosa obtida pelo procedimento de partição líquido/líquido anterior foi solubilizada em *n*-propanol:água (1:1, v/v; 50 mL) e aplicada a uma coluna contendo 200 g de sílica gel 60 (0,05-0,2 mm). Diferentes solventes, com polaridades crescentes, foram eluídos através da coluna: *n*-propanol; *n*-propanol:água (9:1, v/v); *n*-propanol:água (8:2, v/v); *n*-propanol:água (7:3, v/v); *n*-propanol:água (5:5, v/v); água. Frações de 500 mL foram coletadas e cada solvente foi utilizado até que o eluato da coluna não apresentasse mais coloração. As frações foram coletadas, rotaevaporadas e liofilizadas. Após análise de TLC, algumas das frações puderam ser agrupadas de acordo com a similaridade dos componentes presentes e, então, testes de atividade antinociceptiva foram realizados.

3.8.3 Partição líquido-líquido da fração 4B

A fração denominada 4B (1,9 g), uma das sete frações resultante do fracionamento em coluna de sílica gel, apresentou melhor atividade biológica nos testes de avaliação antinociceptiva. Ela foi solubilizada em 15 mL de água destilada e então particionada com butanol resultando em duas frações: solúvel em água (4BA) e solúvel em butanol (4BB). As frações foram concentradas em rotaevaporador e liofilizadas.

3.8.4 Tratamento da fração 4BA com acetona 3 V

A fração 4BA foi ressuspensa em 15 mL de água destilada e tratada com 3 volumes de acetona, resultando em duas frações: uma que foi separada da acetona, formando uma fase (4BAG) e outra solúvel em acetona (4BAC).

Para avaliação qualitativa destas frações foram realizadas cromatografias em camadas delgadas conforme procedimentos descritos no item 3.7.1.

3.8.5 Tratamento da fração 4BAG com resina catiônica

A fração 4BAG foi solubilizada em água e submetida a tratamento com resina catiônica sob agitação, por 10 minutos. A fração solúvel (AC) foi separada e neutralizada com NH_4OH . O material retido na resina (AM) foi retirado após adição de NH_4OH até pH próximo de 11,0. Após evaporação do excesso de NH_3 , as duas frações (AC e AM) foram liofilizadas. A avaliação qualitativa das frações foi realizada por cromatografia em camada delgada conforme procedimento descrito no item 3.7.1.

3.9 Testes de atividade biológica

Os testes de atividade biológica foram realizados no Departamento de Farmacologia da UFPR pela Professora Dra. Maria Fernanda Werner e colaboradores.

3.9.1 Atividade antinociceptiva

3.9.1.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, variedade Swiss) adultos machos, com peso variando entre 15 a 35 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e foram mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração comercial. Os protocolos experimentais foram submetidos à análise pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (autorização número 544) e foram conduzidos de

acordo com os “Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório” (NIH Publication 85-23, revisado 1985). Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar o efeito dos tratamentos.

3.9.1.2 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Os testes das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foram realizados de acordo com a metodologia utilizada por Marcon *et al.* (2009). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de 0,45 ml de ácido acético 0,6%, o qual promove contorções abdominais, que consistem na contração da musculatura abdominal, juntamente com a extensão das patas posteriores. Os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e mantidos por um período de 30 min para aclimação. Em seguida, grupos de animais foram pré-tratados (v.o. ou i.p.) com os extratos e frações da *S. oleracea* 60 minutos antes da injeção de ácido acético ou veículo (10 ml/kg) 30 min antes da injeção do ácido acético. Imediatamente após a injeção do ácido acético, os animais foram recolocados nos funis de vidro e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 min.

3.9.1.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A avaliação dos resultados foi realizada por meio de análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls, quando necessário. Em todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.9.2 Atividade antiulcera gástrica

3.9.2.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar fêmeas com peso variando entre 180 a 200 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e foram mantidos sob condição padrão laboratorial (ciclo de 12 h dia/noite e temperatura de 22 ± 2 °C). Ração comercial e água foram disponibilizadas a vontade. Os experimentos foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética Institucional da UFPR (autorização número 473) e foram conduzidos de acordo com os “Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório” (NIH Publication 85-23, revisado 1985).

3.9.2.2 Indução de lesão gástrica aguda em ratos

As lesões gástricas foram induzidas em ratos em jejum de 18 h, por administração intragástrica de etanol, como descrito previamente por Robert *et al.* (1979). Todos os animais foram tratados oralmente com veículo (água, 0,1 mL/100 g de peso corporal), omeprazol (40 mg/kg), ou com polissacarídeo (1, 3, 10 e 30 mg/kg), 1 h antes da administração do etanol P.A. (0,5 mL/200 g), e então sacrificados 1 h após administração do etanol. Para determinar a extensão da lesão gástrica o estômago foi removido, aberto, fotografado e as lesões gástricas foram mensuradas (mm²) por planimetria computadorizada usando o software Image Tool 3.0. Foram utilizados 6 a 8 animais por grupo.

3.9.2.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias. A significância estatística foi determinada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados foram considerados diferentes para um nível de significância de $p < 0,05$. A dose efetiva 50% (ED₅₀) foi determinada por

regressão não linear usando o *software* Graph-Pad (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Extração e fracionamento de polissacarídeos obtidos a partir da planta inteira de *S. oleracea*

A planta inteira, seca e moída (221,4 g), foi deslipidificada e despigmentada e, posteriormente, submetida a extração aquosa a quente. A extração e as etapas de fracionamento dos polissacarídeos são mostradas resumidamente na Figura 4.

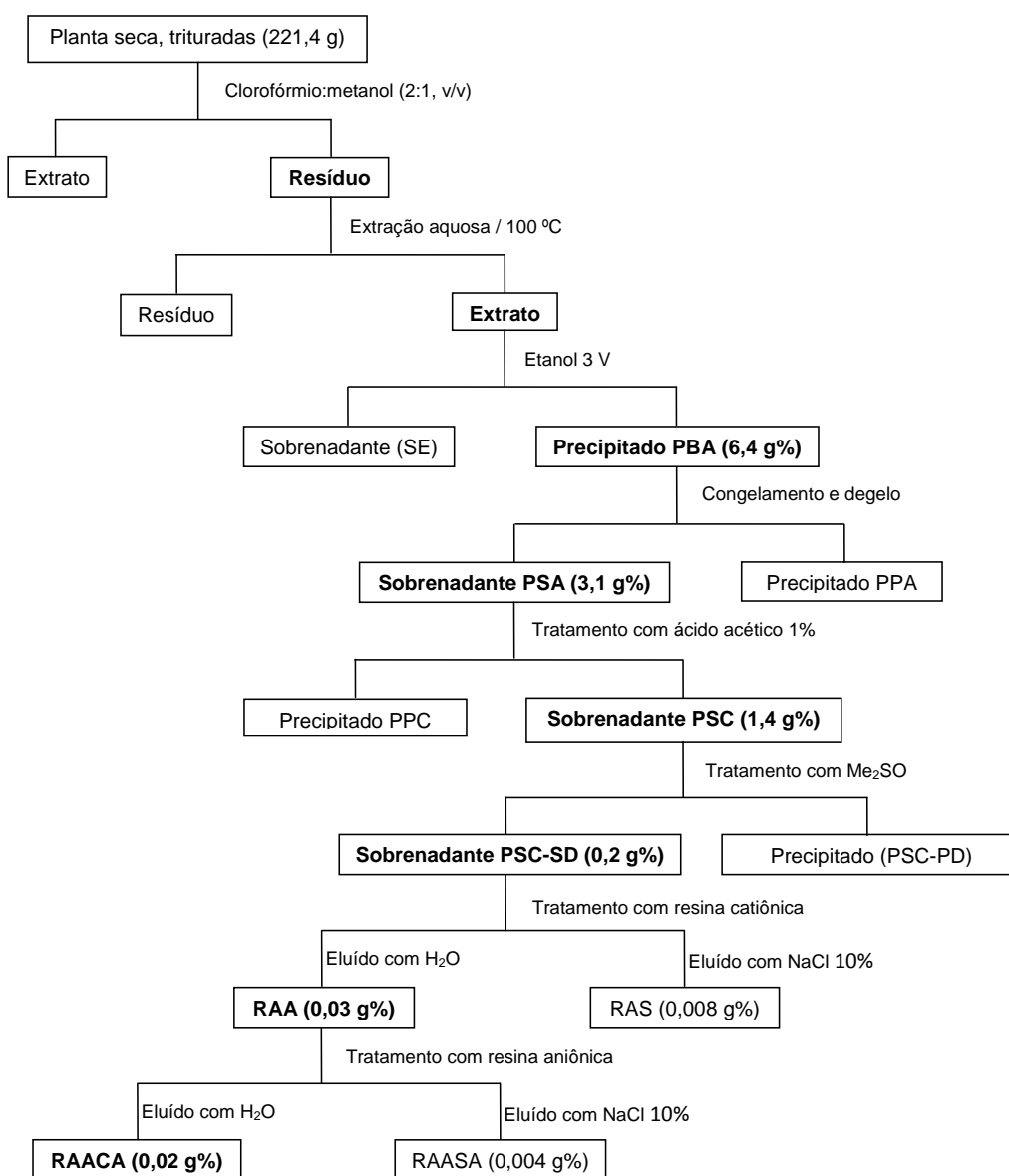


FIGURA 4 – Fluxograma do processo de extração e fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração aquosa da planta inteira de *S. oleracea*.

Os componentes de alta massa molar foram separados dos de baixa massa por tratamento com etanol, o qual resultou em um precipitado (6,4 g%) contendo os polissacarídeos. Esta fração foi submetida, inicialmente, ao processo de fracionamento por congelamento e degelo, rendendo uma fração solúvel e outra insolúvel em água fria. A fração contendo os polissacarídeos solúveis em água (PSA) rendeu 3,1 g% e apresentou Rha, Ara, Gal, Glc e GalA como principais açúcares na análise de composição monossacarídicas (Tabela 1), sugerindo a presença de uma arabinogalactana, uma ramnogalacturonana e, talvez amido nesta fração. Arabinogalactanas são frequentemente encontradas associadas às ramnogalacturonanas (ASPINALL, 1980; BRETT e WALDRON, 1990). Estes dois tipos de polissacarídeos podem ser extraídos com água e pertencem ao grupo das pectinas, o qual é caracterizado pela presença de polissacarídeos ricos em unidades de GalA (AVIGAD e DEY, 1997).

A caracterização do ácido urônico presente em PSA foi realizada por TLC, utilizando padrões de GalA e GlcA como referências (Figura 5). Uma vez que apenas GalA estava presente em PSA, a caracterização do ácido urônico presente nas frações posteriores, derivadas de PSA, não foi necessária, sendo considerado sempre como GalA.

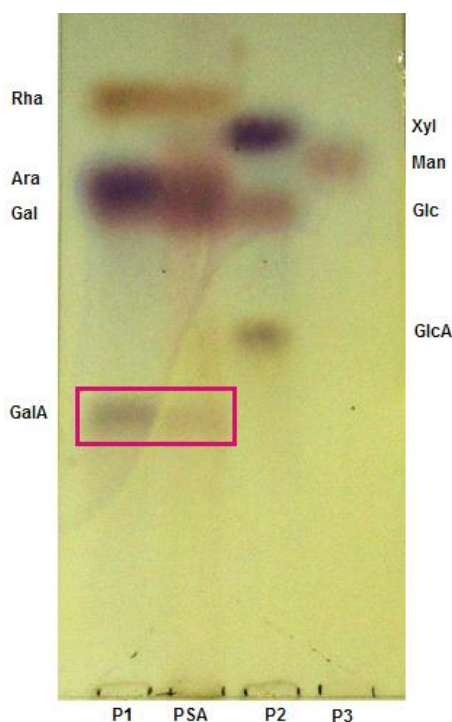


FIGURA 5 – TLC da fração PSA obtida da planta inteira de *S. oleracea*.
Fase móvel: n-propanol:água (7:3, v/v); Revelador: orcinol:H₂SO₄;
P1, P2 e P3 correspondem aos pontos de aplicação dos padrões.

Quando submetida a tratamento com ácido acético a 1%, o pH levemente acidificado (~3,0) possibilitou a formação de duas frações a partir de PSA: uma solúvel em ácido acético 1% (PSC) e outra insolúvel (PPC). De acordo com a análise de composição monossacarídica (Tabela 1), a fração PSC apresentou um maior teor de GalA, quando comparada com a fração PPC, indicando que polissacarídeos pécticos ficaram concentrados em PSC. Esta fração apresentou ainda Rha, Ara, Gal e Glc como principais açúcares neutros na análise de composição monossacarídica. A presença de Glc (13,9 %) poderia estar relacionada à presença de amido. Embora a reação com reativo de lugol tenha sido realizada, não foi possível concluir que amido estava presente, uma vez que a coloração da fração PSC em água era escura, e poderia estar interferindo no resultado da reação com reativo de lugol. Desta forma, mesmo sem ter sido comprovada a presença de amido, a fração PSC foi tratada com a enzima α -amilase. Contudo, não foi observada a redução de seus conteúdos de glucose após o tratamento enzimático, indicando que estas unidades de glucose fazem parte da estrutura de polissacarídeos diferentes do amido.

Continuando com o processo de fracionamento, a fração PSC (1,4 g%) foi submetida à fervura com Me₂SO, rendendo duas frações: uma fração solúvel (PSC-SD) e uma fração insolúvel (PSC-PD) em Me₂SO a quente.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA DA PLANTA INTEIRA DE *S. oleracea* L.

Frações	Rendimentos ⁽¹⁾		Monossacarídeos (%)							
	g	%	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA ⁽²⁾
PBA	14,1	6,4	20,1	0,4	11	4,3	6,0	19,7	17,8	20,6
PSA	6,9	3,1	20,6	0,5	10,9	2,7	4,9	20,7	22,0	17,7
PSC	3,2	1,4	16	0,3	8,6	2,1	3,9	21,8	13,9	33,2
PPC	1,5	0,7	28,2	0,4	13,5	3,4	6,4	17,5	27,6	2,9
PSC-SD	0,4	0,2	12,9	5,4	20,3	0,9	8,5	41,8	10,2	NR
RAACA	0,05	0,02	12,4	0,7	18,3	2,2	10,5	36,5	10,8	8,6

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Partindo de 221,4 g de planta seca; (2) determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Rha (ramnose); Fuc (fucose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); GalA (ácido galacturônico); NR – não realizado.

Em análise de RMN- ^{13}C (Figura 6) a fração PSC-SD, quando comparada com a fração PSC-PD, apresentou sinais mais intensos característicos de polissacarídeos. Estes sinais são visualizados nas regiões entre 100-110 ppm e 60-85 ppm, as quais correspondem às regiões de carbono anomérico e demais carbonos do anel ligados a grupos OH, respectivamente. Por isso, mesmo tendo um menor rendimento (0,2 g%) quando comparada ao rendimento da fração PSC-PD (0,9 g%), a fração PSC-SD foi selecionada para estudo.

Embora o espectro de RMN- ^{13}C de PSC-SD (Figura 6) tenha apresentado sinais característicos de polissacarídeos, ele mostrou uma grande elevação da região entre 65 e 85 ppm, representando a sobreposição de vários sinais nesta região. Com o objetivo de eliminar possíveis compostos presentes junto com os polissacarídeos, a fração PSC-SD foi aplicada em uma coluna montada com resina catiônica e, posteriormente, em uma coluna de resina aniônica. A fração eluída com água nas duas colunas foi denominada RAACA e foi a fração utilizada para a caracterização estrutural. As frações PPA, PPC e PSC-PD não foram analisadas, quanto à estrutura dos polissacarídeos presentes, devido a dificuldades relacionadas à solubilização destas frações para as análises de RMN.

O processo de fracionamento dos polissacarídeos do extrato aquoso, obtido a partir da planta inteira, foi acompanhado por análise de HPSEC. Todas as frações analisadas apresentaram um perfil de eluição heterogêneo. Contudo, como pode ser observado na Figura 7, que a fração RAACA apresentou um pico principal no tempo de 55 min de eluição, o qual deve corresponder ao polissacarídeo majoritário presente nesta fração.

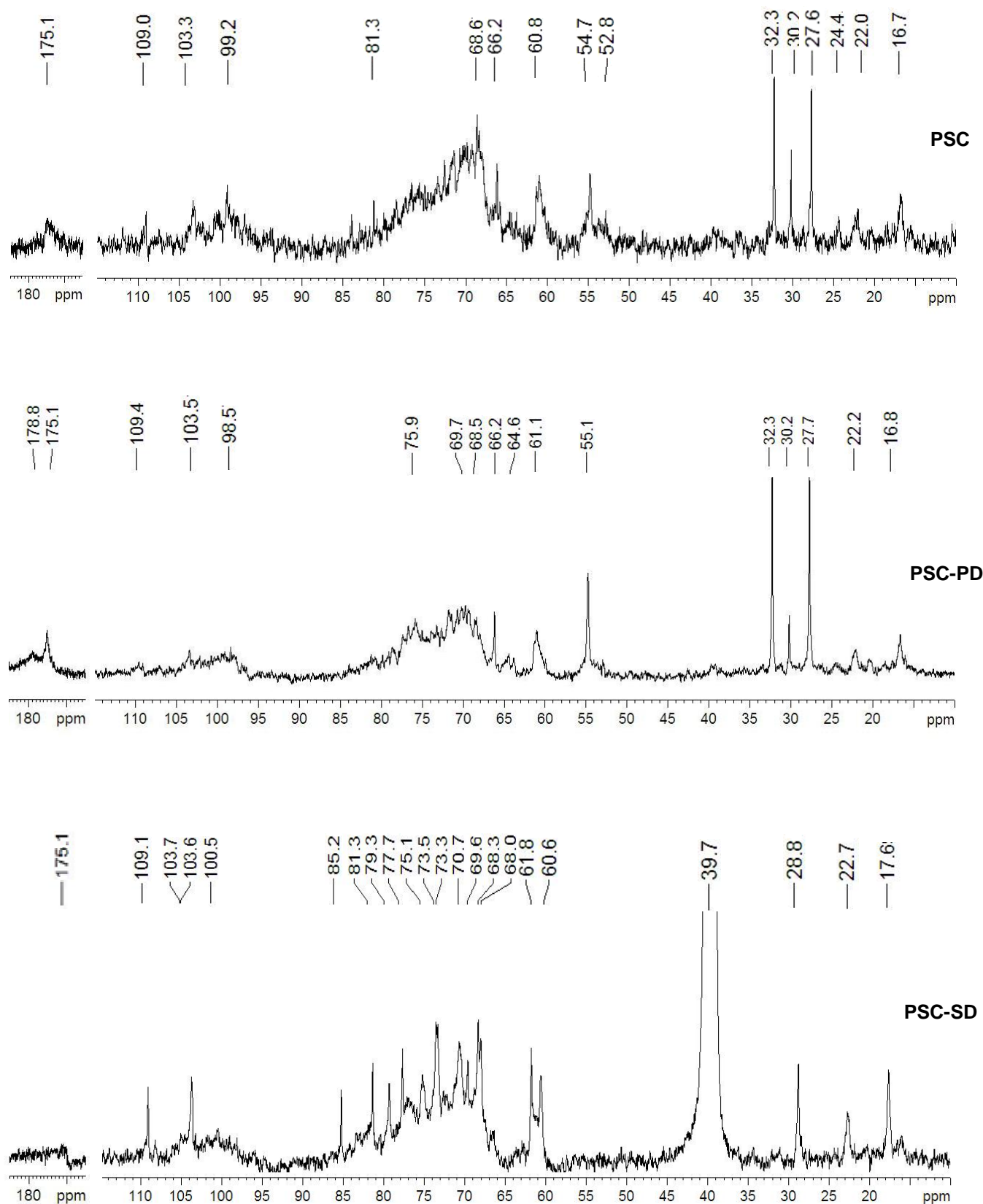


FIGURA 6 – Espectros de RMN- ^{13}C das frações PSC e PSC-PD (em D_2O), e PSC-SD (em $\text{DMSO-}d_6$), a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

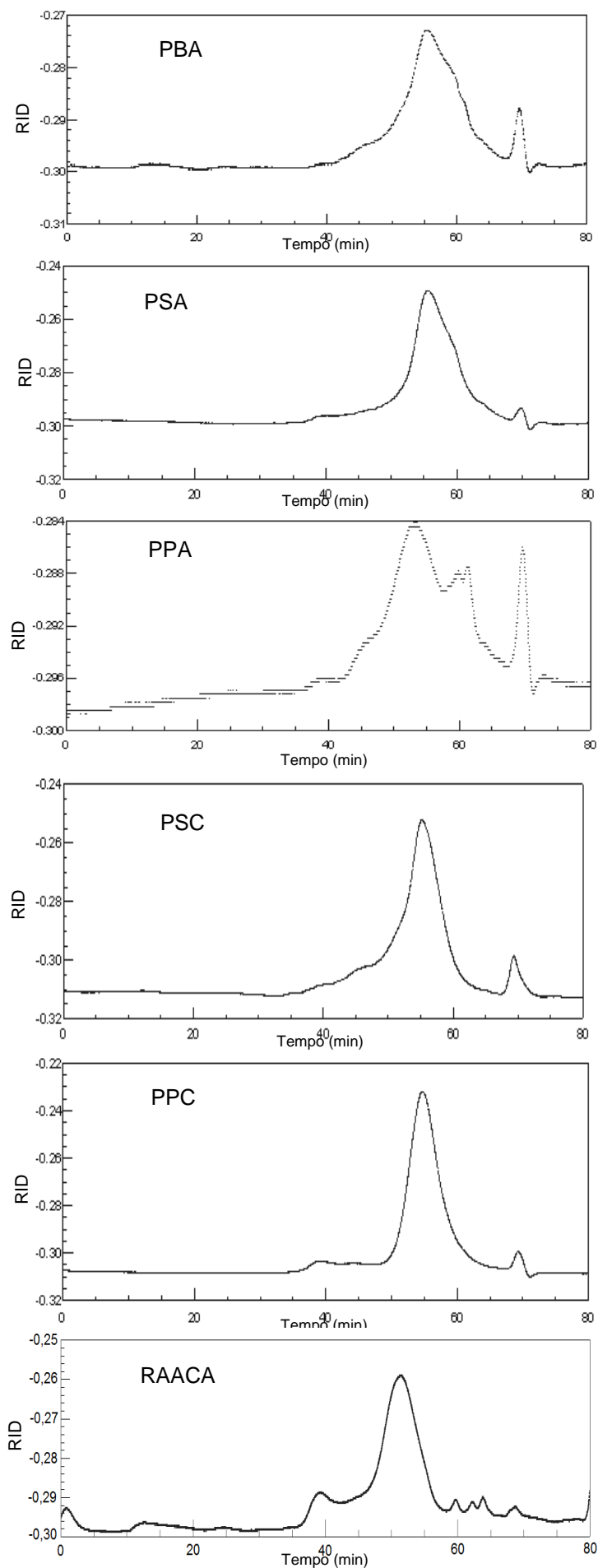


FIGURA 7 – Perfis de eluição em HPSEC, utilizando detector de índice de refração (RID), das frações PBA, PSA, PPA, PSC, PPC e RAACA obtidas pelo processo de fracionamento dos polissacarídeos extraídos com água da planta *S.oleracea*.

4.1.1 Análise estrutural do polissacarídeo presente na fração RAACA obtida a partir de *S. oleracea*

A análise de composição monossacarídica (Tabela 1) mostrou que a fração RAACA apresenta Ara (18,3%) e Gal (36,5%) como principais unidades de açúcares presentes nos seus polissacarídeos, sugerindo a presença de arabinogalactana. Além disso, a presença de Rha (12,4%) e GalA (8,6%) sugere que um polissacarídeo do tipo ramnogalacturonana, também esteja presente em RAACA. As arabinogalactanas são polissacarídeos frequentemente associados às ramnogalacturonanas, por meio de uma ligação glicosídica entre a cadeia de galactose da arabinogalactana com uma unidade de ramnose da ramnogalacturonana (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

A fração RAACA apresentou um espectro de RMN-¹³C (Figura 8) bastante complexo, com muitos sinais na região anomérica (δ 98.2 a 109.1). O sinal observado em δ 109.1 corresponde ao C-1 de unidades de α -L-Araf e aquele em δ 103.4 ao C-1 de unidades de β -D-Galp. Estes sinais são comumente observados em arabinogalactanas (DELGOBO *et al.*, 1998, 1999; CIPRIANI *et al.*, 2006, 2009a). Além disso, sinais típicos de C-6 de GalA (δ 174.5) e C-6 de Rha (δ 16.8) também foram observados.

O espectro de RMN-¹³C DEPT mostrou sinais invertidos em δ 61.0 e 61.5, atribuídos ao C-6 não substituído de unidades de Gal. Já o sinal em δ 69.2, foi atribuído ao C-6 substituído de unidades de Gal.

O espectro de HSQC (RMN-¹³C/¹H) de RAACA (Figura 9) contém sinais em δ 103.2/4.52 (C-1/H-1), 71.0/3.56 (C-2/H-2), 80.1/3.72 (C-3/H-3 substituído), 68.7/4.14 (C-4/H-4), 75.1/3.69 (C-5/H-5), e 69.2/3.94 (C-6/H6 substituído; invertido no DEPT – Figura 8), típicos de unidades de \rightarrow 3,6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow (DELGOBO *et al.*, 1998, 1999; RENARD *et al.*, 1998). Unidades de Galp 3,6-di-O-substituídas estão presentes em arabinogalactanas do tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Ainda, no espectro de HSQC de RAACA (Figura 9), foi possível observar a presença de sinais típicos de C-1/H-1 de α -L-Araf, α -D-GalpA e α -L-Rhap em δ 109.1/5.25, 98.2/5.10, 98.3/5.30, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1998, 1999; RENARD *et al.*, 1998). O sinal de C-6/H-6 das unidades de α -L-Rhap é visualizado em δ 16.9/1.31.

Além disso, a presença de sinal em δ 22.3/2.06 (Figura 9), típico de $-\text{CH}_3$ de grupo acetil, sugere a presença de ácido galacturônico acetilado na posição O-2 ou O-3 (LEROUGE *et al.*, 1993; POPOV *et al.*, 2011). Unidades de GalA acetiladas nas posições O-2 e/ou O-3 são observadas em ramnogalacturonas do tipo I (KOMALAVIVAS e MORT, 1989; LEROUGE *et al.*, 1993).

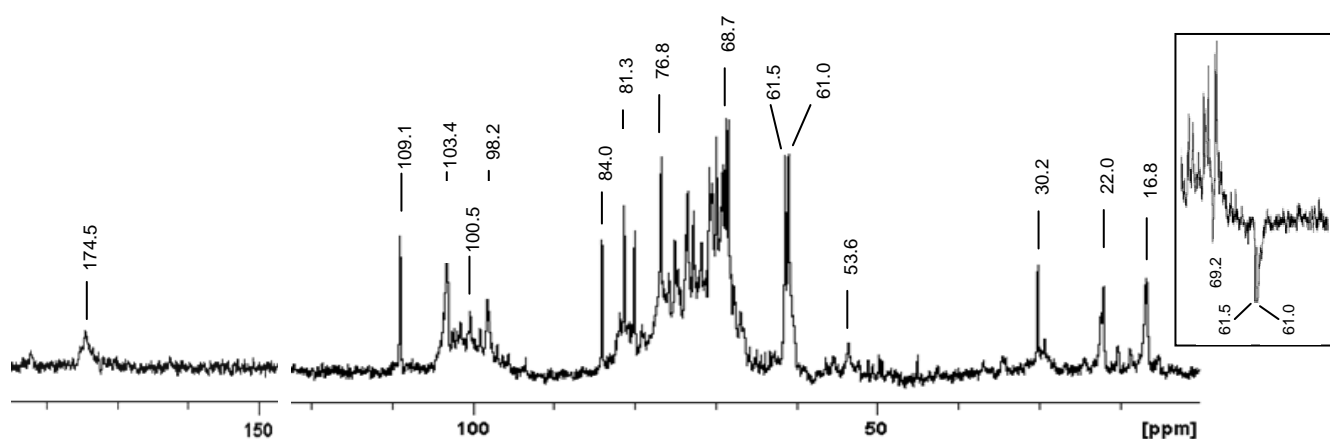


FIGURA 8 – Espectros de RMN- ^{13}C de RAACA (em D_2O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. Inseto: DEPT-RMN- ^{13}C .

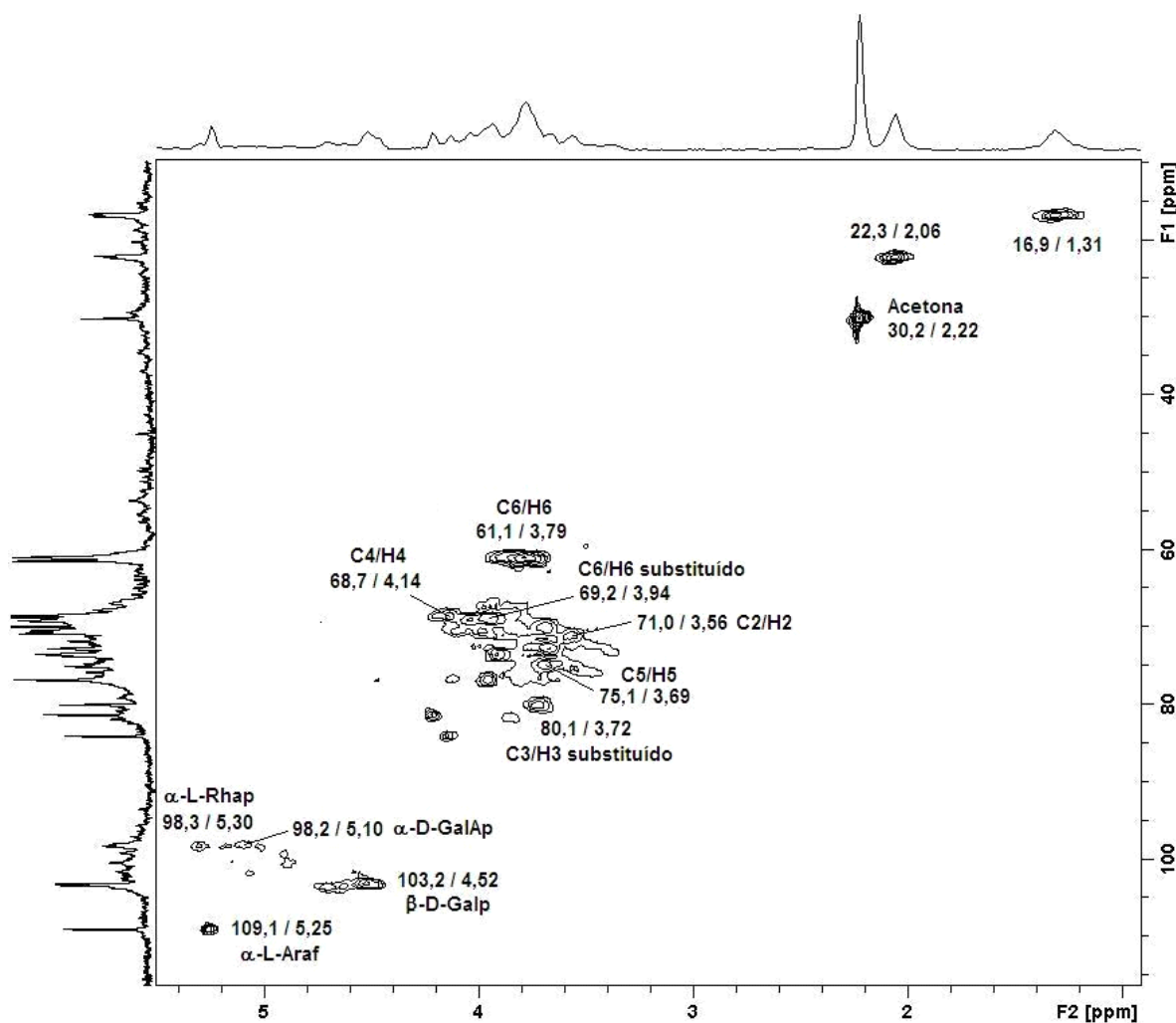


FIGURA 9 – Espectro de HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) de RAACA (em D_2O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

4.1.1.1 Análise de metilação de RAACA

A análise de metilação foi realizada com RAACA e RAACA carboxirreduzida (RAACA-CR). A carboxirredução foi necessária uma vez que nas condições de análise adotadas os acetados de alditóis parcialmente metilados, das unidades de ácidos urônicos, não são analisados. Após a carboxirredução, as unidades de GalA presentes em RAACA são convertidas em Gal e, desta forma, podem ser analisadas. A análise de metilação da fração RAACA (Tabela 2) apresentou 7,8% de terminais não redutores de Araf, pela presença do derivado metilado 2,3,5-Me₃-Ara. Terminais não redutores de Galp também estão presentes, como indicado pela presença do derivado 2,3,4,6-Me₄-Gal (9,4%). Outros derivados encontrados em

RAACA são 2,4,6-Me₃Gal (6,2%), 2,3,4-Me₃-Gal (6,9%) e 2,4-Me₂-Gal (14,8%), indicando que a cadeia principal do polissacarídeo presente em RAACA é composta por unidades de Galp 3-O-, 6-O- e 3,6-di-O-substituídas. Estes resultados sugerem a presença de uma arabinogalactana do tipo II em RAACA, visto que este tipo de polissacarídeo é caracterizado por apresentar cadeia principal de (1→3) e/ou (1→6) β-D-galactanas, conectadas umas as outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6 (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Os terminais não redutores de Araf provavelmente ramificam a cadeia principal nas posições O-3 e O-6 de algumas unidades de Galp, como frequentemente observado para as arabinogalactanas do tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Desta forma, os dados de metilação apresentados na Tabela 2 estão em acordo com o resultado obtido pela análise de RMN.

Contudo, a presença do derivado metilado 2,3,6-Me₃-Gal (4,4%) pode estar relacionada à existência, também, de uma arabinogalactana do tipo I na fração RAACA. Este tipo de arabinogalactana é caracterizado por uma cadeia principal constituída por unidades de β-D-galactose (1→4)-ligadas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Porém, não pode ser excluída a presença de uma galactana linear.

Comparando-se o resultado da análise de metilação das amostras nativa e carboxirreduzida (Tabela 2), é possível observar um aumento na concentração do derivado 2,3,6-Me₃-Gal em 3,8% após a carboxirredução de RAACA, indicando a presença de resíduos de GalpA (1→4)-ligados. Além disso, a presença dos derivados 3,4-Me₂-Rha (3,2%) e 3-Me-Rha (6,4%) indicaram que resíduos de Rhap 2-O- e 2,4-di-O-substituídos também estão presentes. Unidades de GalpA 4-O-substituídas e de Rhap 2-O- e 2,4-di-O-substituídas são constituintes comuns de ramnogalacturonanas do tipo I (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Estas ramnogalacturonanas são formadas pela repetição da unidade dissacarídica [→4)-α-D-GalpA-(1→2)-α-L-Rhap-(1→], tendo frequentemente o C-4 das unidades de Rha substituídas por arabinanas, galactanas e/ou arabinogalactanas (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

A análise de metilação mostrou ainda que cerca de 40% das unidades de glucose da fração RAACA são terminais não redutores e a outra parte é (1→4)-ligada, de acordo com a presença dos derivados metilados 2,3,4,6-Me₂-Glc (3,3%) e 2,3,6-Me₃-Glc (5,0%), respectivamente. Assim, pelo menos parte das unidades de glucose de RAACA deve compor um polissacarídeo diferente do amido. Além disso,

uma vez que RAACA apresenta 10,5% de unidades de manose em sua composição monossacarídica (Tabela 1), possivelmente outro polissacarídeo pode estar presente nesta fração. De acordo com a análise de metilação (Tabela 2), 62% das unidades de manose presentes em RAACA são (1→2)-ligadas e 38% são (1→3)-ligadas.

TABELA 2 – ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE RAACA E RAACA-CR.

Derivado Metilado	Ligações	$t_R^{(1)}$	RAACA	RAACA-CR
2,3,5-Me ₃ -Ara	terminal	0,798	7,8	9,2
2,3-Me ₂ -Rha	→)4-	0,973	5,0	4,6
3,4-Me ₂ -Rha	→)2-	0,957	3,2	3,9
2,4-Me ₂ -Rha	→)3-	0,983	4,0	4,0
2,3,4,6-Me ₂ -Glc	terminal	1,000	3,3	4,6
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	terminal	1,055	9,4	8,2
3-Me-Rha	→)2,4-	1,219	6,4	6,3
3,4,6-Me ₃ -Man	→)2-	1,256	6,0	5,4
2,4,6-Me ₃ -Man	→)3-	1,284	3,7	5,4
2,4,6-Me ₃ -Gal	→)3-	1,321	6,2	8,6
2,3,6-Me ₃ -Gal	→)4-	1,353	4,4	8,2
2,3,6-Me ₃ -Glc	→)4-	1,383	5,0	8,2
2,3,4-Me ₃ -Gal	→)6-	1,551	6,9	6,2
2,4-Me ₂ -Gal	→)3,6-	2,128	14,8	13,4
2-Me-Ara	→)3,4-	2,238	5,4	3,6
GalA ⁽²⁾			8,6	-

NOTAS: (1) t_R = tempo de retenção relativo ao do 2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucitol; (2) determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

De acordo com os resultados obtidos, o polissacarídeo majoritário presente na fração RAACA é uma arabinogalactana do tipo II. Ela é formada por uma cadeia principal de unidades de β -D-Galp (1→3)-ligadas, substituída em O-6 por cadeias laterais de β -D-Galp (1→6)-ligadas. As cadeias laterais são substituídas em O-3 por terminais não redutores de α -L-Araf. Esta arabinogalactana do tipo II provavelmente

está ligada na posição O-4 de algumas unidades de ramnose, de uma ramnogalacturonana do tipo I, formada pela repetição da unidade dissacarídica $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow]$. Uma estrutura sugerida para a arabinogalactana e a ramnogalacturonana presentes em RAACA é mostrada na Figura 10.

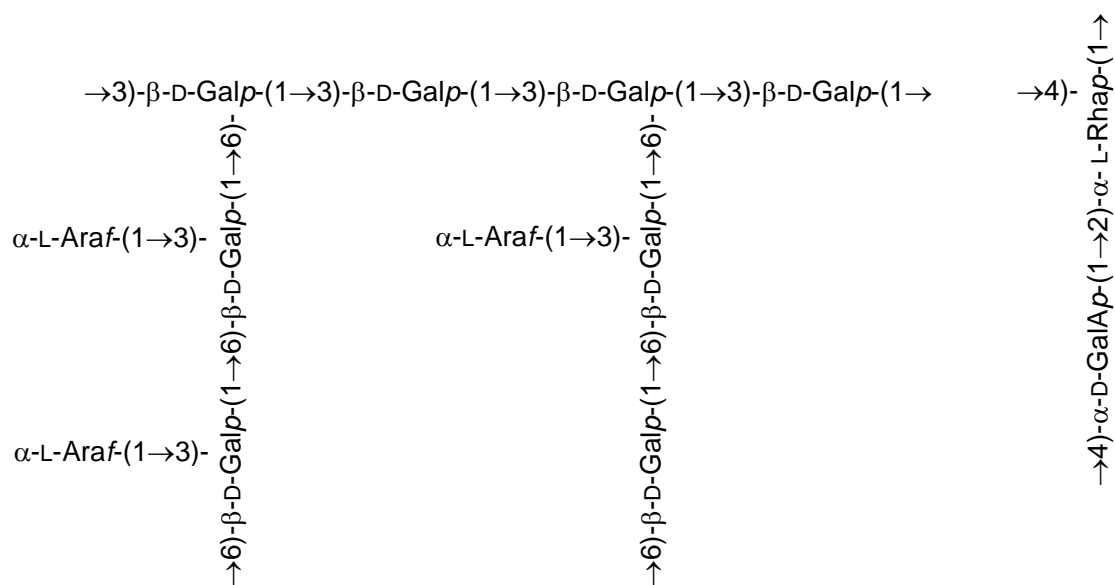


FIGURA 10 – Estrutura sugerida para a arabinogalactana do tipo II e para a ramnogalacturonana do tipo I presentes na fração RAACA.

4.2 Extração e fracionamento de polissacarídeos obtidos a partir da folhas

As folhas secas e moídas de *S. oleracea* (46,7 g) foram deslipidificadas e despigmentadas com clorofórmio:metanol (2:1 v/v) e então submetidas ao processo de extração aquosa sob refluxo para obtenção dos polissacarídeos. O extrato aquoso, depois de concentrado em rotaevaporador, foi tratado com etanol 3 volumes resultando em um precipitado contendo os polissacarídeos (9,0 g%). Esta fração bruta de polissacarídeos foi submetida ao processo de fracionamento por congelamento e degelo. A fração solúvel do processo de congelamento e degelo SA (5,8 g%) foi tratada com ácido acético (pH ~3,0) resultando em uma fração precipitada e outra solúvel em ácido acético. O componente solúvel foi separado do precipitado por centrifugação seguida de ultrafiltração, resultando na fração SC com 2,1 g% de rendimento. A extração e as etapas de fracionamento dos polissacarídeos extraídos a partir das folhas estão mostradas resumidamente na Figura 11.

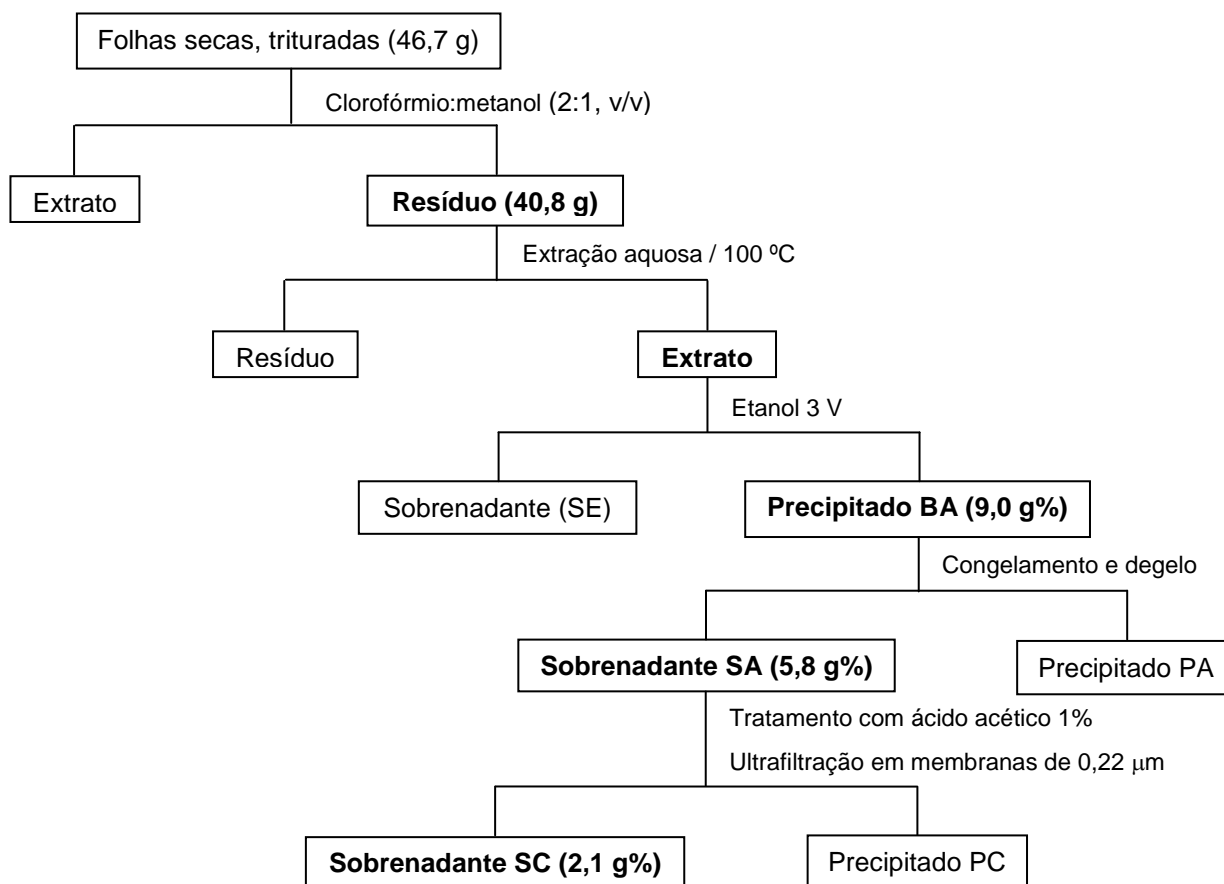


FIGURA 11 – Fluxograma do processo de extração e fracionamento dos polissacarídeos obtidos por extração aquosa das folhas de *S. oleracea*.

Análise por cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) mostrou que a fração SC é homogênea, com M_w de 226.000 g/mol ($dn/dc=0,140$) (Figura 12).

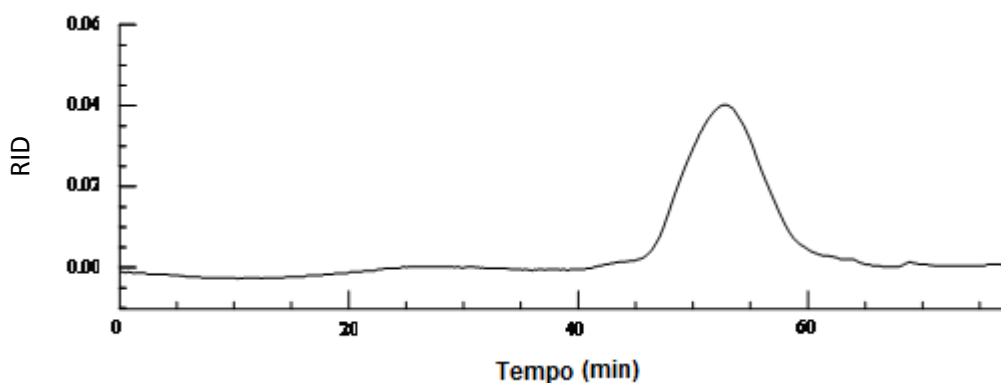


FIGURA 12 – Perfil de eluição em HPSEC, utilizando detector de índice de refração (RID), da fração SC obtida pelo processo de fracionamento dos polissacarídeos extraídos com água das folhas de *S. oleracea*.

4.2.1 Análise estrutural do polissacarídeo presente na fração SC obtida a partir de *S. oleracea*

Conforme a análise de composição monossacarídica (Tabela 3), a fração SC continha ácido urônico, galactose, arabinose, ramnose e glucose em uma razão molar de 15:2:1:1:0,5. A análise por TLC da fração SC hidrolisada indicou a presença de ácido galacturônico (Figura 13).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE *S. oleracea* L.

Frações	Rendimento ⁽¹⁾		Monossacarídeos (%)							
	g	%	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA ⁽²⁾
SC	1,0	2,1	5,3	-	5,0	-	-	8,5	3,4	75,7
SC-CR ⁽³⁾			8,3	-	7,0	-	-	64,0	7,1	11,9

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS. (1) Partindo de 46,7 g de folhas secas; (2) determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Rha (ramnose); Fuc (fucose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); GalA (ácido galacturônico); (3) SC carboxirreduzida.



FIGURA 13 – TLC das frações SC e SC-CR provenientes das folhas de *S. oleracea*. Fase móvel: n-propanol:água (7:3, v/v); Revelador: orcinol:H₂SO₄; P1 e P2 correspondem aos pontos de aplicação dos padrões.

4.2.1.1 Análise de metilação de SC

A análise de metilação foi realizada com a fração SC e SC carboxirreduzida (SC-CR) (Tabela 3), uma vez que ácido galacturônico está presente em SC. Após a carboxirredução, as unidades de ácido galacturônico foram convertidas para unidades de galactose e, desta forma, os derivados metilados relativos às unidades de ácido galacturônico podem ser visualizados como derivados metilados de galactose na análise de metilação. Em SC-CR estão presentes terminais não redutores de Araf (4,8%), Arap (4,7%), Rhap (1,4%), Glcp (3,1%), e Galp (3,9%). Algumas unidades de arabinose foram 5-O-substituídas (1,9%), unidades de Rha estavam 2-O- (1,8%), 3-O- (1,3%) e 2,4-di-O-substituídas (1,2%), e unidades de Galp estavam, principalmente, 4-O- (39,4%), 6-O- (4,4%), 2,4-di-O- (9,7%), e 3,6-di-O-substituídas (3,9%).

Na análise de metilação de SC (Tabela 3), somente 2,1% de unidades de Galp 4-O-substituída estavam presentes, enquanto em SC-CR, 39,4%. Além do mais, unidades de Galp 2,4-di-O-substituídas apareceram somente na fração carboxirreduzida (9,7%). Desta forma, unidades de ácido galacturônico 4-O- e 2,4-di-O-substituídas estão presentes em SC.

Resíduos de ácido galacturônico 4-O-substituídos estão presentes em dois tipos de polissacarídeos, a saber, ácido poligalacturônico e ramnogalacturonanas. Estas últimas podem ser formadas por uma longa sequência de unidades de ácido α -D-galacturônico (1 \rightarrow 4)-ligadas, interrompida por unidades de α -L-Rhap (CARPITA e GIBEAUT, 1993). A cadeia principal formada principalmente por GalpA e algumas unidades de Rhap é frequentemente substituída por cadeias laterais de arabinanas, galactanas, ou arabinogalactanas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Com exceção das unidades de galactose geradas a partir da carboxirredução das unidades de ácido galacturônico, a maioria das unidades de Galp de SC-CR são 3-O- (2,2%), 6-O- (4,4%) e 3,6-di-O-substituídas (3,9%), o que é compatível com uma arabinogalactana do tipo II (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

TABELA 4 – ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE SC E SC-CR.

Derivado Metilado	Ligações	$t_R^{(1)}$	SC	SC-CR
2,3,5-Me ₃ -Ara	terminal	0,800	2,2	4,8
2,3,4-Me ₃ -Ara	terminal	0,829	-	4,7
2,3,4-Me ₃ -Rha	terminal	0,856	-	1,4
3,4-Me ₂ -Rha	\rightarrow 2-	0,956	-	1,8
2,4-Me ₂ -Rha	\rightarrow 3-	0,956	-	1,3
2,3,4,6-Me ₂ -Glc	terminal	1,000	1,2	3,1
2,3-Me ₂ -Ara	\rightarrow 5-	1,032	1,3	1,9
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	terminal	1,053	1,2	3,9
3-Me-Rha	\rightarrow 2,4-	1,215	-	1,2
2,4,6-Me ₃ -Gal	\rightarrow 3-	1,315	1,5	2,2
2,3,6-Me ₃ -Gal	\rightarrow 4-	1,346	2,1	39,4
2,3,6-Me ₃ -Glc	\rightarrow 4-	1,377	4,0	2,6
2,3,4-Me ₃ -Gal	\rightarrow 6-	1,542	5,1	4,4
2,6-Me ₂ -Gal	\rightarrow 3,4-	1,623	-	1,7
3,6-Me ₂ -Gal	\rightarrow 2,4-	1,763	-	9,7
2,4-Me ₂ -Gal	\rightarrow 3,6-	2,107	5,7	3,9
GalA ⁽²⁾		-	75,7	11,9

NOTAS: (1) t_R = tempo de retenção relativo ao do 2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol; (2) determinações de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

4.2.1.2 Análise de RMN de SC

O espectro de RMN- ^{13}C de SC (Figura 14) mostrou sinais típicos de C-1 de unidades de α -L-Araf e β -D-Galp em δ 109.5 e 103.4, respectivamente. Conforme descrito para a fração RAACA, estes sinais são comumente observados em arabinogalactanas (DELGOBO *et al.*, 1998; CIPRIANI *et al.*, 2006, 2009a). Além disso, também foram observados sinais de C-6 de unidades de GalA metil-esterificadas (δ 170.7) e C-6 de Rha (δ 16.7). O sinal intenso em δ 52.8 é referente ao $-\text{CO}_2-\text{CH}_3$ das unidades de GalA.

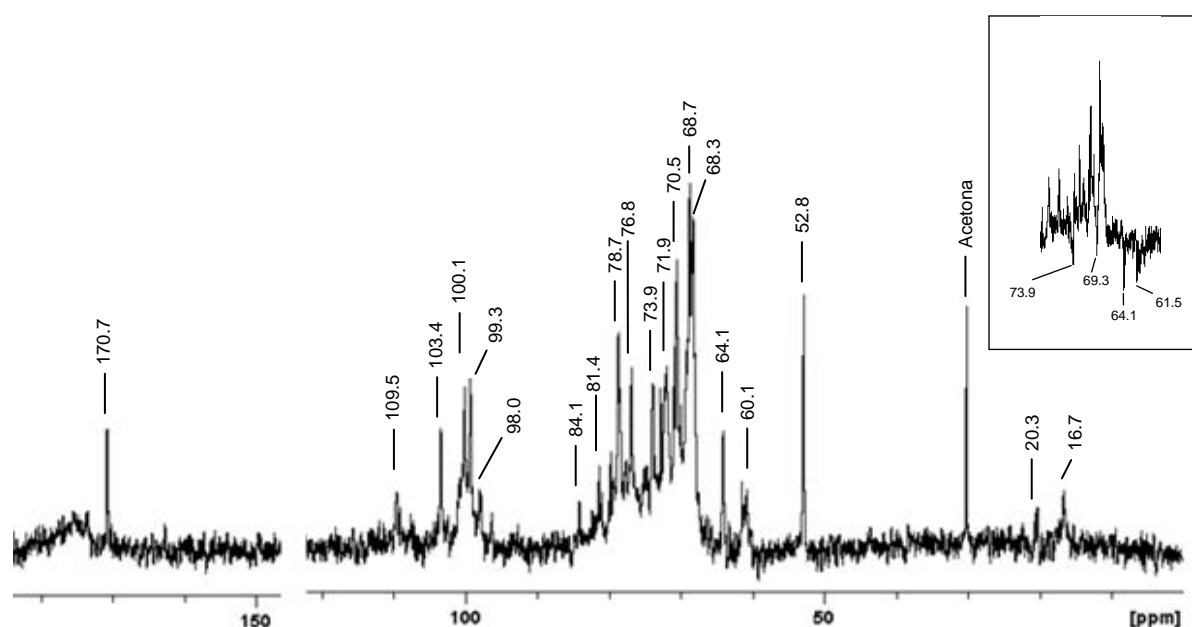


FIGURA 14 – Espectros de RMN- ^{13}C de SC (em D_2O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. Inseto: DEPT-RMN- ^{13}C .

O espectro de HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) de SC (Figura 15) contém sinais em δ 100.2/4.96 (C-1/H-1), 68.2/3.74 (C-2/H-2), 68.7/3.98 (C-3/H-3), 78.7/4.46 (C-4/H-4), 70.6/5.11 (C-5/H-5), e 170.7 (C-6), típicos de unidades de α -D-GalpA (1 \rightarrow 4)-ligadas (RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011). Quando as unidades de GalpA estão substituídas em OH-2, os sinais de C-2/H-2 de GalpA aparecem em δ 76.7/4.00. O sinal em δ 52.9/3.81 é do metil-éster de unidades de

GalpA. O espectro de HMBC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) de SC (Figura 16) contém acoplamentos em δ 170.7/3.81 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_3$) e 170.7/5.11 ($-\text{CO}_2-\text{CH}_3$ com H-5 de GalpA). Sinais de C-5/H-5 de unidades de GalpA não esterificadas deveriam aparecer perto de δ 72.5/4.65 (RENARD *et al.*, 1998; POPOV *et al.*, 2011), mas não estão presentes no espectro obtido da fração SC. Além disso, no espectro de HMBC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) de SC não é possível observar outros sinais na região de C-6 de ácido galacturônico, indicando que praticamente todas as unidades de GalpA da fração SC podem ser esterificadas por grupos metil. A presença de C-1/H-1 e C-6/H-6 de unidades de Rhap (1 \rightarrow 2)-ligadas foi mostrada pelos sinais em δ 99.5/5.18 e 16.8/1.28, respectivamente (RENARD *et al.*, 1998). Os resultados obtidos por espectroscopia de RMN estão de acordo com a análise de metilação, sugerindo que a fração SC é uma ramnogalacturonana, formada por uma longa sequência de unidades de \rightarrow 4)-6-OMe- α -D-GalpA-(1 \rightarrow , intercalada por umas poucas unidades de α -L-Rhap.

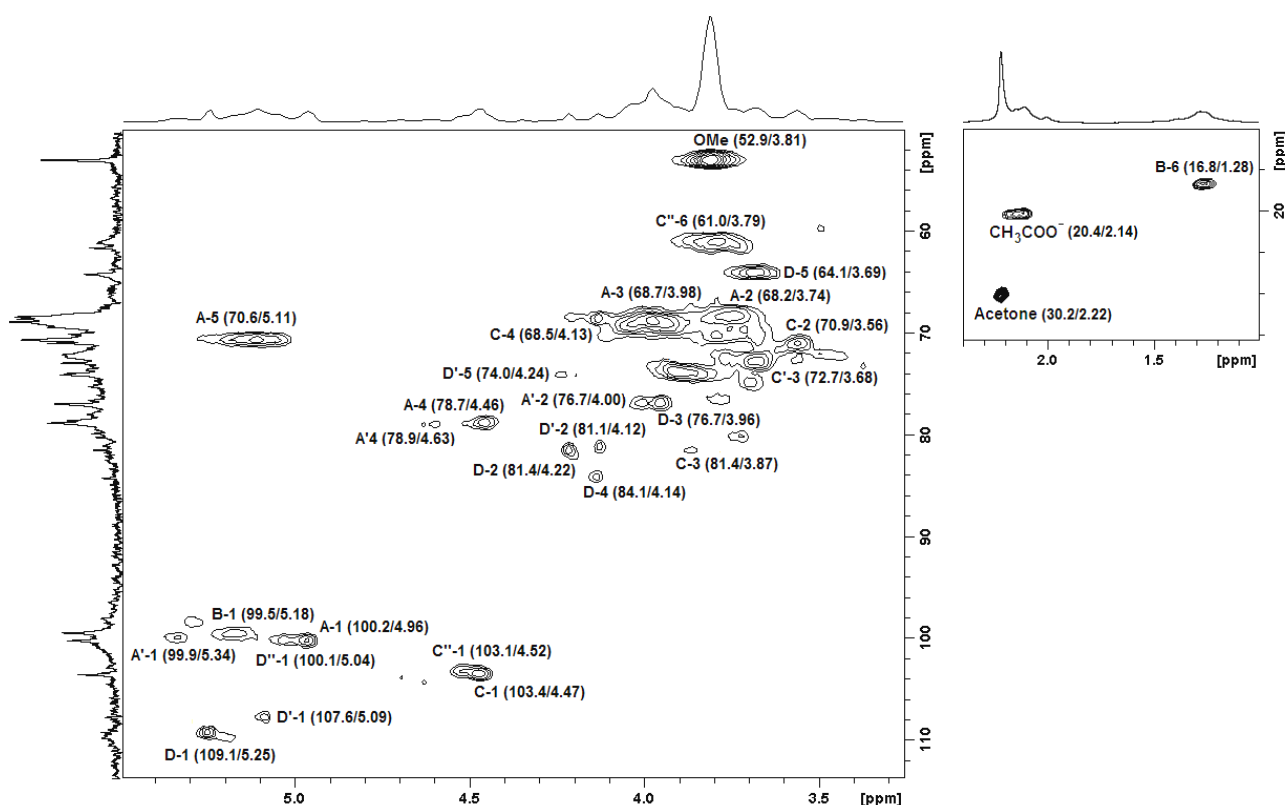


FIGURA 15 – Espectro de HSQC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) de SC (em D_2O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. A, A' (6-OMe- α -D-GalpA); B (1 \rightarrow 2)-ligadas; C, C', C'' (β -D-Galp); D, D' (α -L-Araf); D'' (β -L-Arap)

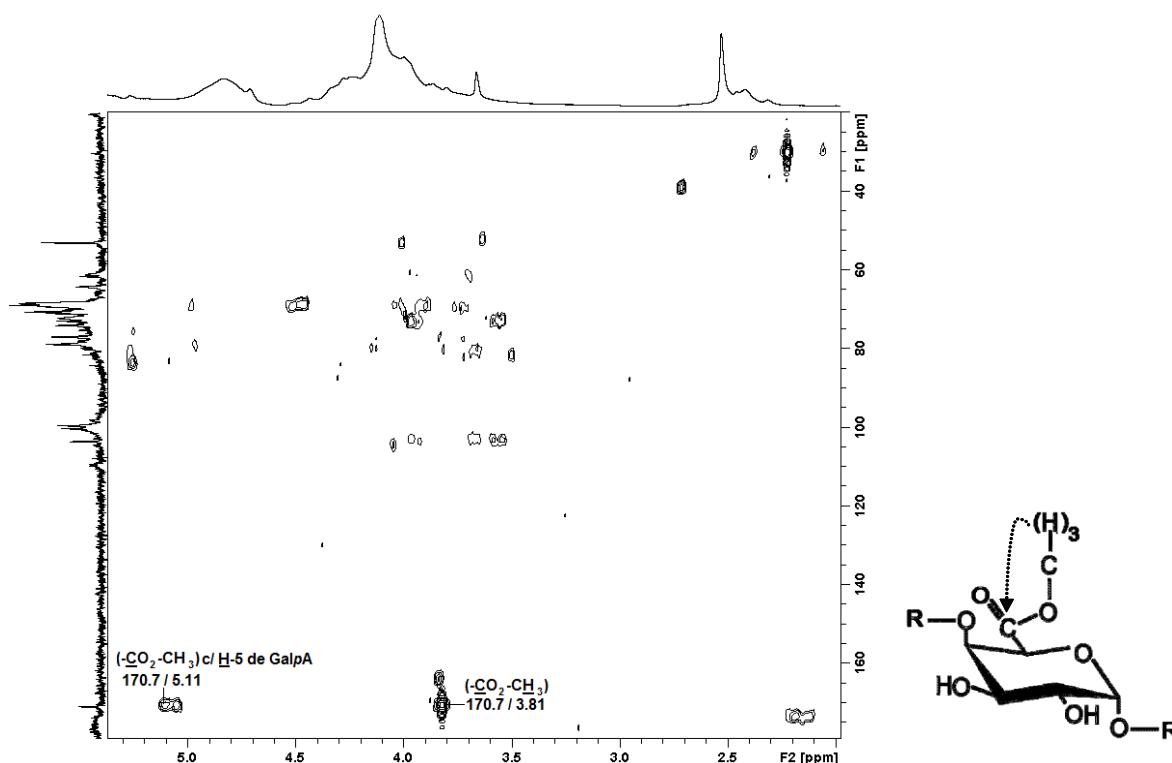


FIGURA 16 – Espectro de HMBC (RMN- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$) de SC (em D_2O), a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

Grupos acetil podem estar presentes em ramnogalacturonanas, frequentemente como substituintes em OH-2 ou OH-3 de unidades de GalpA (LEROUGE *et al.*, 1993; POPOV *et al.*, 2011). Uma vez que há um sinal em δ 20,4/2,14, típico de grupos acetil, no espectro de HSQC (Figura 15), estes grupos podem estar presentes em SC. Contudo, nenhum sinal de acoplamento entre $\text{H}_3\text{C}-\text{COO}-$ e H-2 ou H-3 de unidades de 6-OMe-GalpA foi detectado no experimento de HMBC (Figura 16), não sendo possível a determinação da posição dos grupos acetil.

O espectro de HSQC da fração SC (Figura 15) apresenta também sinais em δ 103.4/4.47 e 103.1/4.52 de C-1/H-1 de unidades de β -D-Galp. Sinais de C-3/H-3 em δ 81.4/3.87 e C-6 em δ 69.3 (DEPT-RMN- ^{13}C , inserto da Figura 14) são de unidades de $\rightarrow 3,6$ - β -D-Galp-(1 \rightarrow). Os sinais em 61.0/3.79 (C-6/H-6) e 72.7/3.68 (C-3/H-3) são de unidades de β -D-Galp 3-O- e 6-O-substituídas, respectivamente (DELGOBO *et al.*, 1998). Sinais típicos de C-1/H-1 e C-5/H-5 de α -L-Araf foram observados no HSQC. Aqueles em δ 109.1/5.25 e 64.1/3.69 são de terminais não redutores de α -L-Araf, e os sinais em δ 107.6/5.09 e 74.0/4.24 (DEPT-RMN- ^{13}C , inserto da Figura 14) são de unidades de α -L-Araf 5-O-substituídas. Conforme a

análise de metilação, terminais não redutores de unidades de Arap estão também presentes em SC. No espectro de HSQC foi observado um sinal em δ 100.1/5.04, atribuível a C-1/H-1 de unidades de β -L-Arap (DELGOBO *et al.*, 1998).

Arabinogalactanas do tipo I e do tipo II são classificadas de acordo com sua cadeia principal. As primeiras têm uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-ligadas, enquanto as últimas têm uma cadeia principal constituída por unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 3)-ligada, substituída na posição OH-6 por cadeias laterais de β -D-Galp (1 \rightarrow 6)-ligadas. Unidades terminais não redutoras de arabinose e cadeias de α -L-Araf 3-O- e/ou 5-O-substituídas estão presentes em ambos os tipos de arabinogalactanas (CARPITA e GIBEAUT, 1993). A fração SC é, portanto, também composta por uma pequena porção de arabinogalactanas do tipo II, provavelmente ligadas a uma ramnogalacturonana do tipo I. Uma proposta de estrutura para SC é mostrada na Figura 17.

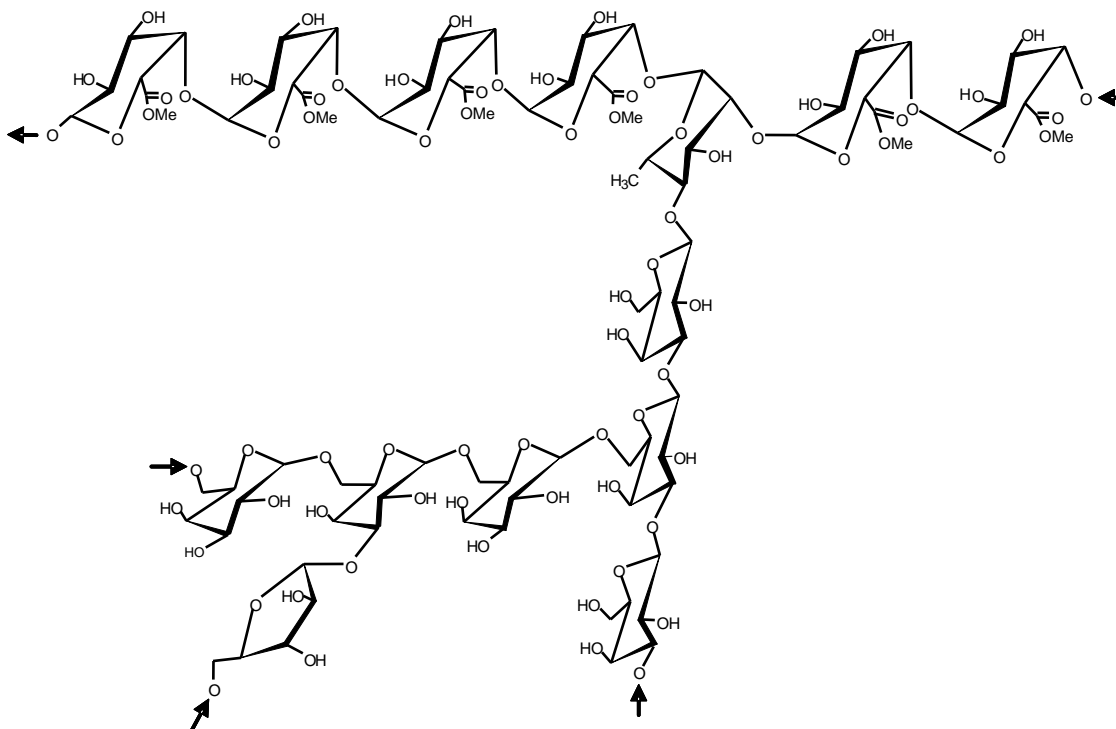


FIGURA 17 – Esquema da estrutura sugerida para o polissacarídeo SC.

4.2.2 Avaliação da atividade antiúlcera gástrica da fração SC

Alguns estudos têm mostrado que polissacarídeos podem produzir efeito gastroprotetor (NERGARD *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2006, 2009a, 2009b), entretanto esta propriedade não foi ainda descrita para ramnogalacturonanas metil-esterificadas. Desta forma, para investigar se SC exerce uma ação antiúlcera, etanol absoluto foi administrado para produzir injúria hemorrágica na mucosa gástrica de ratos. A administração de etanol causou lesão severa no grupo controle ($181,0 \pm 27,7 \text{ mm}^2$). O tratamento oral de animais com SC, nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg, reduziu a lesão gástrica induzida pelo etanol de maneira dose-dependente, com uma ED_{50} de 1,5 mg/kg. O controle positivo, omeprazol (40 mg/kg), promoveu 93% de gastroproteção (Figura 18).

Estes resultados sugerem uma atividade potencial de SC para atuar como um agente citoprotetor, ligando-se à superfície da mucosa gástrica, funcionando como uma camada protetora. A proteção da mucosa gástrica pode ocorrer também pela habilidade do polissacarídeo de aumentar a síntese de muco e/ou de modular o sistema antioxidante, como previamente observado para uma arabinosilana (MELLINGER-SILVA *et al.*, 2011).

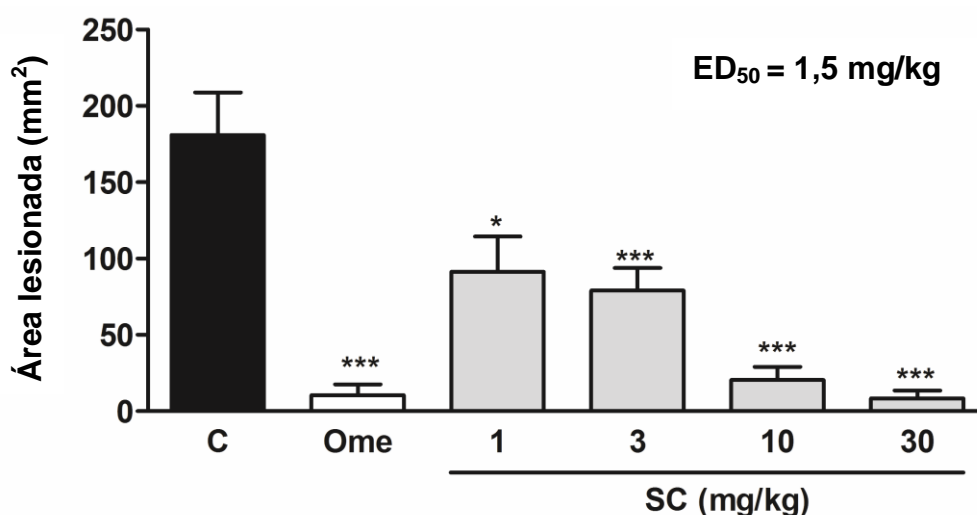


FIGURA 18 – Efeito de SC (1, 3, 10 e 30 mg/kg, *p.o.*) contra lesões gástricas induzidas por etanol (C: controle, água 0,1 ml/100g, *v.o.* e Ome: omeprazol 40 mg/kg, *v.o.*). Os resultados são expressos como média \pm S.E.M. (n=6-8). Comparação estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

4.3 Fracionamento bioquímico de compostos de baixa massa molar

O extrato aquoso proveniente da planta inteira de *S. oleracea*, foi tratado com etanol, fornecendo um precipitado (PBA) e uma fração solúvel, denominada sobrenadante etanólico (SE; 10,3 g%). A fração SE foi submetida a testes de atividade antinociceptiva, tanto por administração via oral quanto intraperitoneal (Figura 19). O efeito mais significativo foi de 80,4% de atividade antinociceptiva quando SE foi administrado numa concentração de 10 mg/kg, por via intraperitoneal. Como a via intraperitoneal apresentou a melhor resposta com uma dose menor, esta foi a via escolhida para os testes subsequentes, realizados com as frações obtidas a partir do fracionamento da fração SE. A extração e as etapas de fracionamento bioquímico dos compostos de baixa massa molar estão mostradas resumidamente na Figura 20.

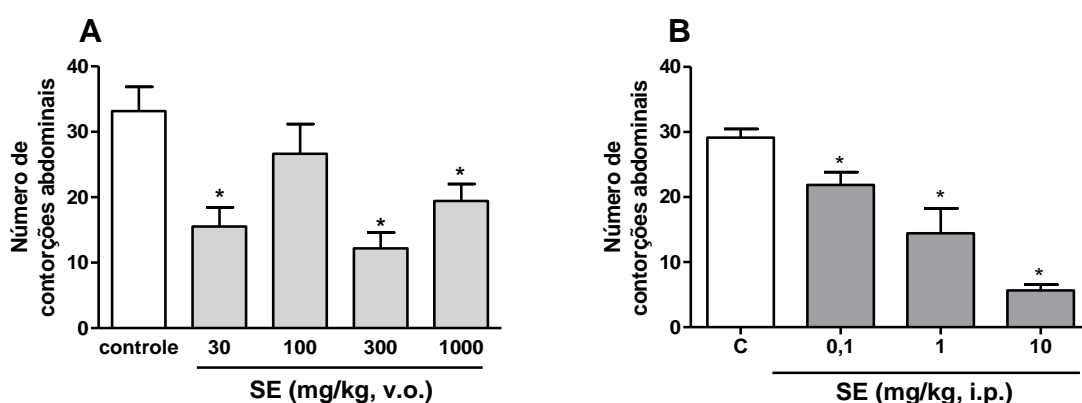


FIGURA 19 – Efeito da fração SE quando administrada por via oral (A) e via intraperitoneal (B), na nocicepção visceral induzida por ácido acético (0,6%, i.p.). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 7$ a 10). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Valores de $*p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes do controle (veículo).

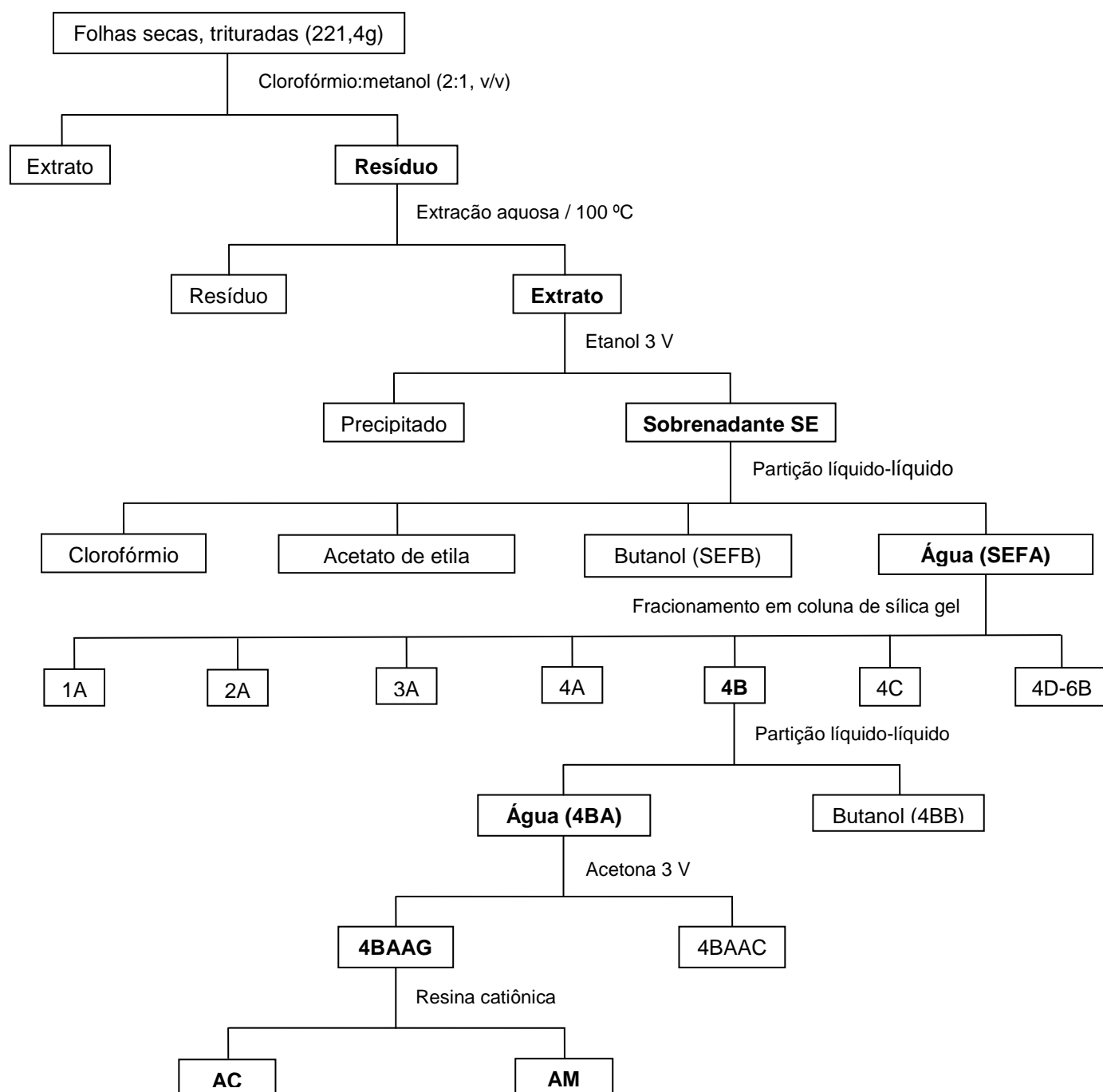


FIGURA 20 – Fluxograma do processo de obtenção e fracionamento de SE, obtido a partir da extração aquosa da planta *S. oleracea*.

A fração SE, após avaliação de atividade antinociceptiva, foi submetida a partição líquido-líquido, obtendo-se quatro novas frações: clorofórmio (0,6 g%), acetato de etila (0,3 g%), butanol (SEFB, 9,8 g%) e água (SEFA, 71,1 g%) (Figura 20). Os rendimentos foram considerados a partir da quantidade obtida de SE. Testes para atividade antinociceptiva das frações SEFA e SEFB, que apresentaram os melhores rendimentos, mostraram que SEFA apresentou inibição de 75,3% da dor numa concentração de 1 mg/kg, quando administrada por via i.p., com uma curva dose-dependente (Figura 21). A fração butanólica (SEFB), apesar de ter apresentado atividade antinociceptiva, não apresentou uma curva com resposta dose-dependente. Portanto, a fração SEFA foi utilizada nos fracionamentos subsequentes.

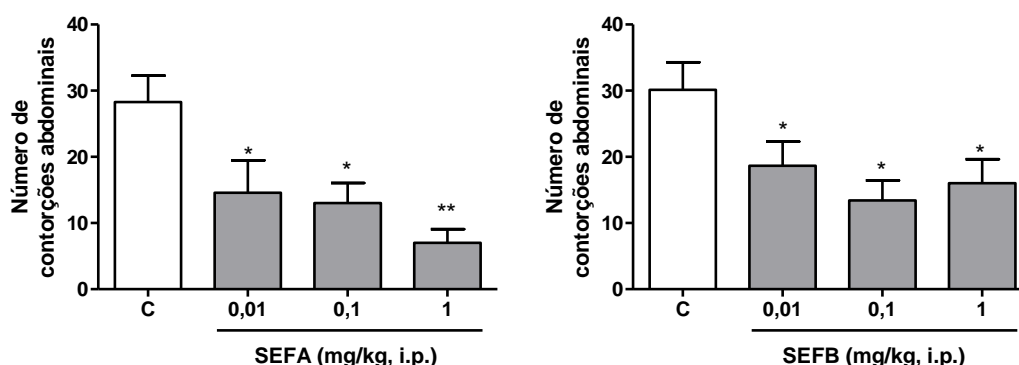


FIGURA 21 – Efeito das frações SEFA e SEFB quando administradas por via intraperitoneal na nocicepção visceral induzida por ácido acético (0,6% i.p.). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 7$ a 10). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Valores de $*p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes do controle (veículo).

Por ter apresentado melhor resultado no teste de atividade antinociceptiva, a fração SEFA foi solubilizada em propanol:água (1:1, v/v) e fracionada por cromatografia em coluna de sílica gel, com eluição com propanol, propanol:água em vários gradientes de concentração, e água. As frações e os rendimentos obtidos são apresentados na Tabela 5. Estas frações foram analisadas por TLC (Figura 22), e aquelas com perfil cromatográfico semelhante foram agrupadas. Assim, as frações 4D a 6B foram agrupadas. Desta forma, o fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel resultou em sete frações (1A, 2A, 3A, 4A, 4B, 4C e 4D-6B) que foram submetidas a testes de atividade antinociceptiva.

TABELA 5 – FRAÇÕES OBTIDAS PELO FRACIONAMENTO DE SEFA EM COLUNA DE SÍLICA GEL.

Solventes	Frações	Rendimento	
		g	%
1- propanol	1A	0,83	5,8
2 – propanol – água (9:1)	2A	1,01	7,1
3 – propanol – água (8:2)	3A	0,95	6,7
4 – propanol – água (7:3)	4A	2,4	16,9
	4B	1,9	13,3
	4C	1,6	11,2
	4D	0,5	3,5
	4E	0,17	1,2
	4F	0,1	0,7
	4G	0,06	0,4
5 – propanol – água (1:1)	5A	0,1	0,7
	5B	0,07	0,5
	5C	0,04	0,3
6 – água	6A	0,08	0,6
	6B	0,06	0,4

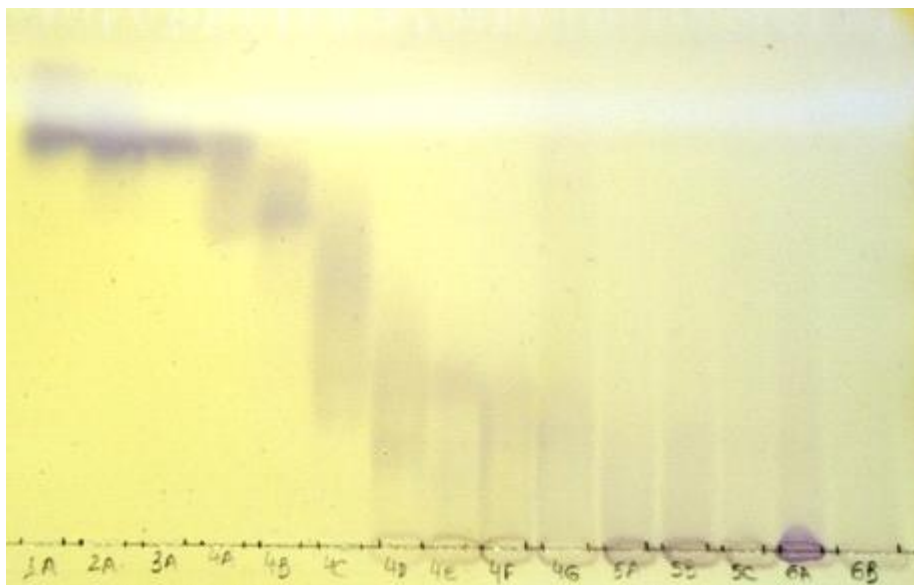


FIGURA 22 – TLC das frações 1A, 2A, 3A, 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, 4G, 5A, 5B, 5C, 6A, 6B, obtidas a partir do fracionamento de SEFA por cromatografia em coluna de sílica gel. Revelador: orcinol:H₂SO₄

Todas as frações (1A, 2A, 3A, 4A, 4B, 4C e 4D-6B) apresentaram atividade antinociceptiva numa concentração de 0,01 mg/kg, por via intraperitoneal (Figura 23), no entanto, a fração 4B apresentou a melhor atividade ao inibir a dor em 69%. Com isto, acredita-se que na fração 4B há uma concentração maior de moléculas com atividade antinociceptiva. Desta forma, esta fração foi solubilizada em água e submetida a partição líquido-líquido com butanol, rendendo duas frações: uma fração solúvel em água (4BA) e outra solúvel em butanol (4BB). As moléculas menos polares da fração 4B ficaram solubilizadas na fase butanólica (4BB) e aquelas com polaridade maior na fase aquosa (4BA). Os rendimentos das frações 4BA e 4BB, em relação à fração SE, foram 3,87 g% e 0,6 g%, respectivamente.

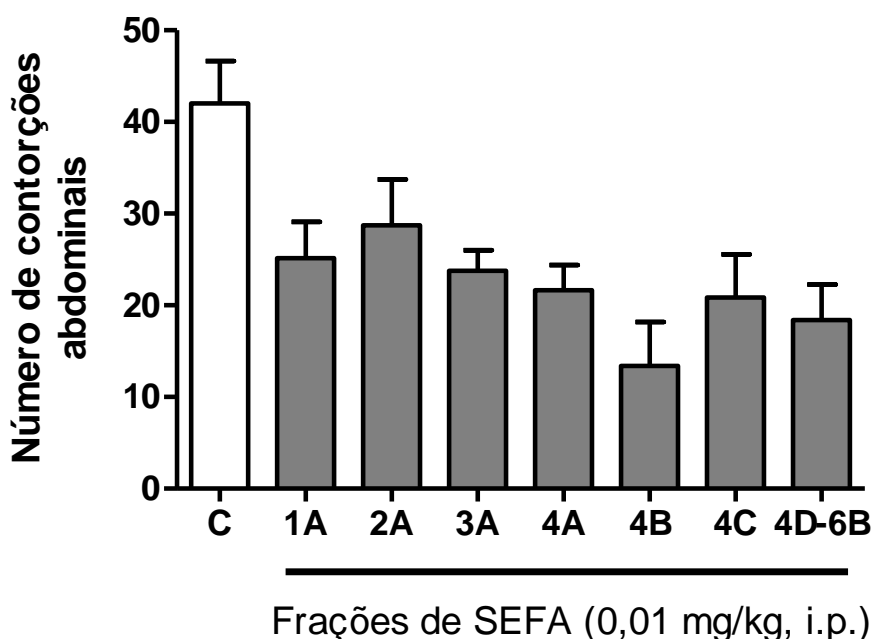


FIGURA 23 – Efeito das frações 1A, 2A, 3A, 4A, 4B, 4C E 4D-6B quando administradas por via intraperitoneal na nocicepção visceral induzida por ácido acético (0,6% i.p.). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 7$ a 10). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Newman Keuls. Valores de $*p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes do controle (veículo).

As frações 4BA e 4BB foram submetidas a análise de RMN- ^{13}C (Figura 24). Na fração 4BA foi observada a presença de sinais típicos de carboidratos, com sinais na região de carbono anomérico (δ 90 a 110), sugestivos da presença de oligossacarídeos. Além disso, foram observados sinais de grupos carboxílicos (δ 170 a 185), sinais referentes a carbono com insaturação (δ 120 a 150), sinais sugestivos de carbono ligado a grupo amina (δ 50 a 55), e sinais de $-\text{CH}_2-$ (δ 35 a 45), sugerindo fortemente a presença de peptídeos ou aminoácidos livres.

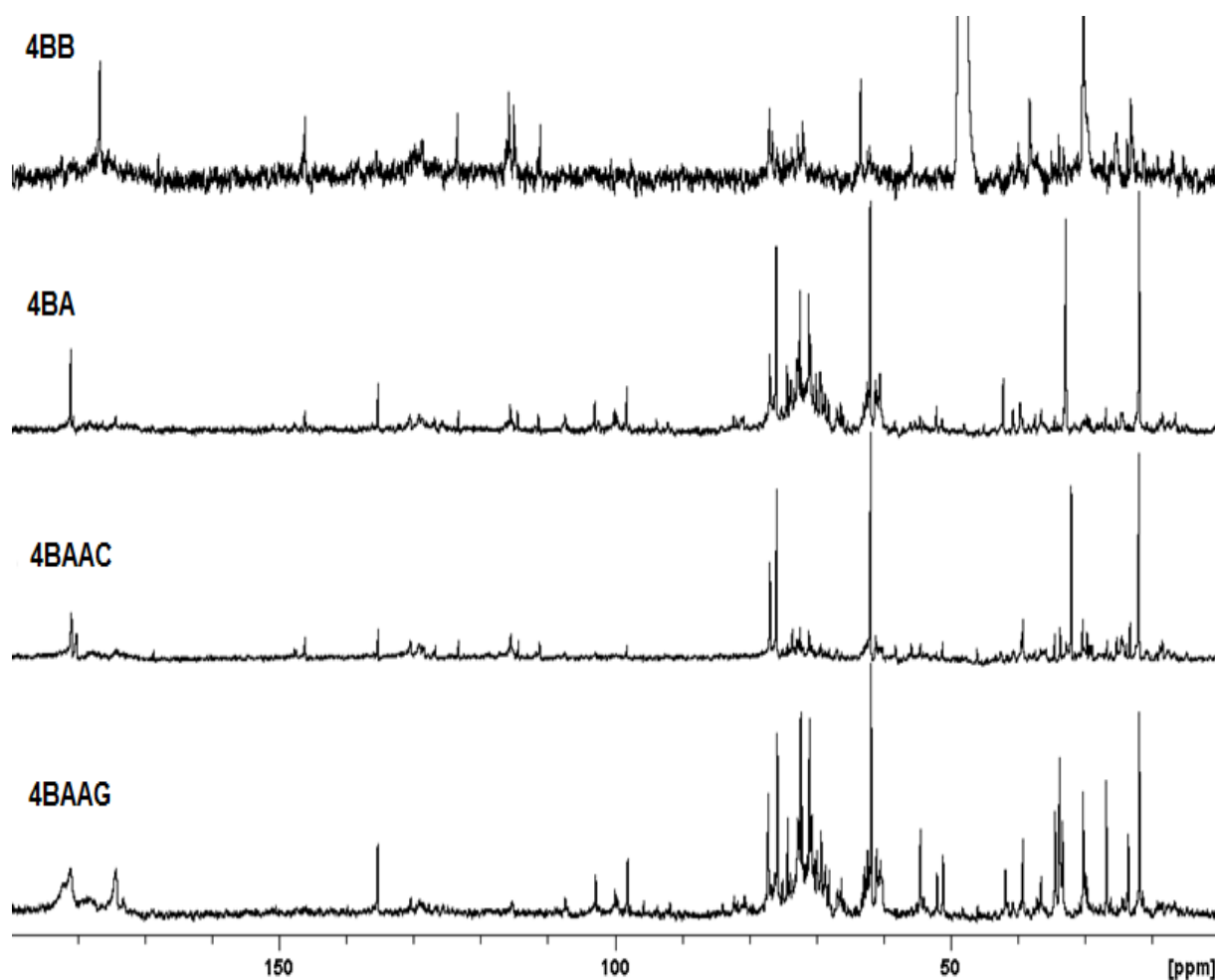


FIGURA 24 – Espectros de RMN-¹³C das frações 4BB (em DMSO-*d*₆), 4BA (em D₂O), 4BAAC (em D₂O) e 4BAAG (em D₂O), a 30 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

Por apresentar sinais característicos de carboidratos em seu espectro de RMN-¹³C, a fração 4BA foi tratada com acetona 3 volumes, objetivando a separação destes dos demais compostos presentes. Este procedimento resultou em duas frações, provenientes da separação do material em duas fases: uma que se separou da acetona (4BAAG), que apresentou 1,17 g% de rendimento, e uma solúvel em acetona (4BAAC), com rendimento de 2,7 g%.

Análise de RMN-¹³C (Figura 24) mostrou que os sinais típicos da região de carbono anomérico (δ 90 a 110) estão presentes em 4BAAG, mas são pouco visíveis

em 4BAAC. Desta forma, houve uma concentração dos carboidratos na fração 4BAAG, após o tratamento de 4BA com acetona.

As frações 4BAAG e 4BAAC foram analisadas por TLC utilizando-se duas fases móveis diferentes e, também, dois reveladores diferentes (Figura 25). Nas TLCs reveladas com ninhidrina foi verificada a presença de compostos aminados. Naquelas reveladas com orcinol:H₂SO₄ foi verificada uma banda principal, proeminente, referente a carboidrato. As análises com diferentes fases móveis indicaram que os compostos aminados não estão no mesmo R_f dos componentes carboidratos, indicando que os carboidratos presentes nestas frações não estão covalentemente ligados aos compostos aminados. Isso pode ser facilmente visualizado nas TLCs cuja fase móvel foi *n*-propanol:água (70:30, v/v).

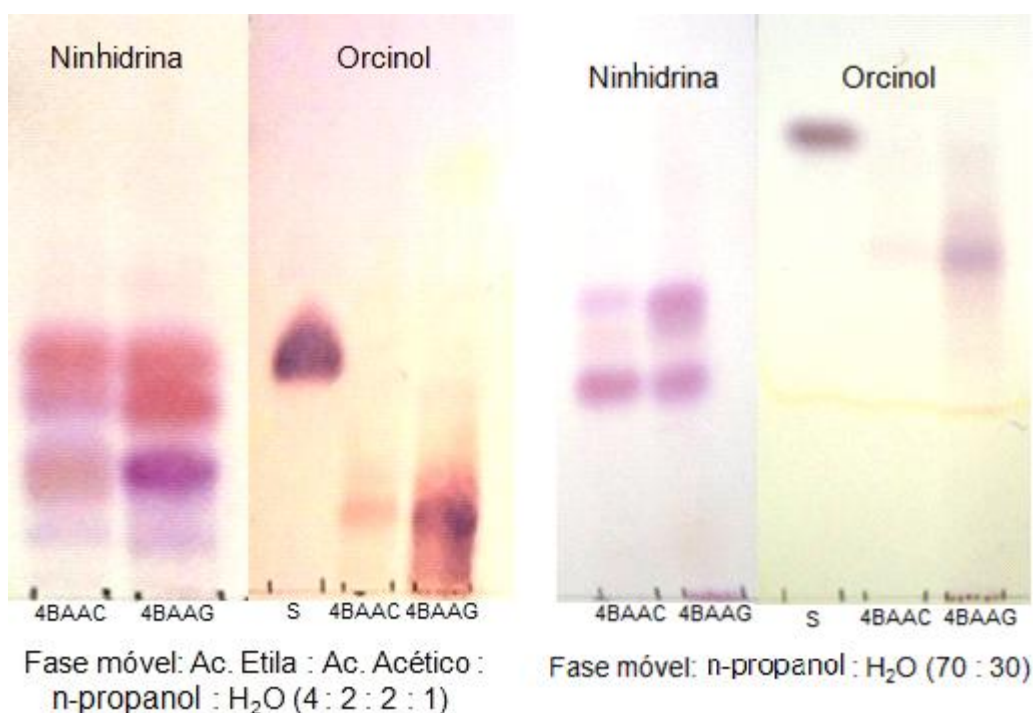


FIGURA 25 – Cromatografia em camada delgada das frações 4BAAC e 4BAAG, juntamente com padrão sacarose (S).

Conforme observado na análise por RMN-¹³C e TLC, carboidratos ficaram concentrados na fração 4BAAG (Figuras 24 e 25). Para verificar se alditóis, monossacarídeos livres, e/ou oligossacarídeos estavam presentes em 4BAAG, esta fração foi avaliada por GC-MS após acetilação direta (I), redução e acetilação (II), e hidrólise, redução e acetilação (III). Os resultados obtidos estão na Tabela 6. Foi observado que inositol representa uma grande proporção dos carboidratos presentes na fração 4BAAG. Uma proporção muito pequena de outros alditóis também foi observada (galactitol, manitol, xilitol e arabitól). Uma vez que não houve grande diferença nas análises (I) e (II), monossacarídeos livres estão presentes em uma proporção muito pequena (Glc, Ara e Rha). Quando a amostra foi previamente hidrolisada (III), Ara, Man, Gal e Glc foram observadas em maiores proporções, com uma diminuição proporcional do teor de inositol (Tabela 6). Estes resultados indicam que oligossacarídeos ou glicosídeos constituídos por Ara, Man, Gal e Glc estão presentes na fração 4BAAG.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO 4BAAG ACETILADA (I), REDUZIDA E ACETILADA (II), E HIDROLISADA, REDUZIDA E ACETILADA (III).

Frações	Monossacarídeos (%)							Inositol
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
I	-	-	0,3	4,4	1,9	4,7	-	88,6
II	1,5	-	1,3	0,4	1,2	4,6	2,3	88,7
III	1,9	-	19,6	2,4	10,3	17,8	14,9	32,8

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS. Rha (ramnose); Fuc (fucose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); GalA (ácido galacturônico).

Para verificar se os compostos aminados presentes em 4BAAC e 4BAAG eram aminoácidos, foi realizada uma análise em TLC com os padrões de aminoácidos mais comuns (Figura 26). De acordo com a comparação dos R_fs e da coloração das bandas, aspartato parece estar presente na fração 4BAAG, asparagina na fração 4BAAC, e glutamato nas duas frações. Contudo, compostos

aminados diferentes dos outros aminoácidos estão presentes, uma vez que não houve outras coincidências de R_fs.

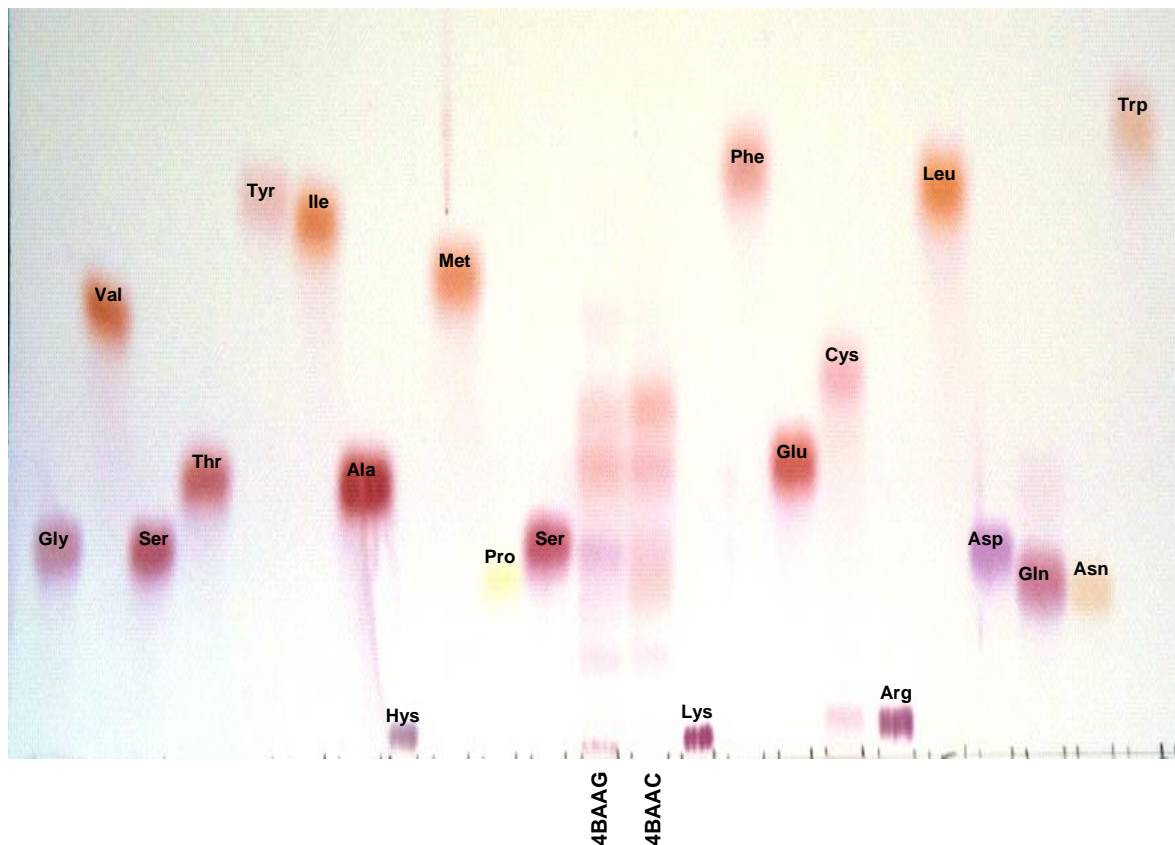


FIGURA 26 – Cromatografia em camada delgada das frações 4BAAC e 4BAAG, juntamente com padrões de aminoácidos: glicina (Gly); valina (Val); serina (Ser); treonina (Thr); tirosina (Tyr); isoleucina (Ile); alanina (Ala); histidina (Hys); metionina (Met); prolina (Pro); lisina (Lys); fenilalanina (Phe); glutamato (Glu); cisteína (Cys); arginina (Arg); leucina (Leu); aspartato (Asp); glutamina (Gln); asparagina (Asn); triptofano (Trp). Fase móvel: acetato de etila:ácido acético:n-propanol:água (4:2:2:1, v/v); Revelador: ninhidrina.

Com o objetivo de separar os compostos aminados dos carboidratos, na tentativa de elucidar a estrutura química destes últimos, a fração 4BAAG foi tratada com resina catiônica, obtendo-se duas frações: uma não retida (AC; 0,6 g%) e outra retida na resina (AM; 0,8 g%). As duas frações foram, então, analisadas por TLC (Figura 27). Os compostos aminados ficaram concentrados na fração AM e os componentes contendo carboidratos, na fração AC.



FIGURA 27 – TLC das frações AC e AM.

Fase móvel: acetato de etila:ácido acético:*n*-propanol:água (4:2:2:1).

Reveladores: ninhidrina e orcinol:H₂SO₄.

A fração AC foi, ainda, submetida a análise por TLC para verificar se sacarose ou rafinose poderiam estar presentes (Figura 28). Contudo, não houve coincidência de migração destes padrões com as bandas da fração AC.

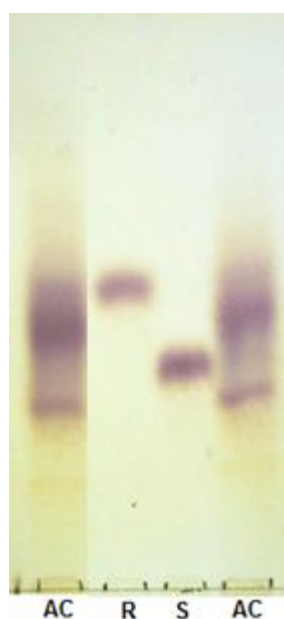


FIGURA 28 – TLC da fração AC. Padrões: rafinose (R); sacarose (S). Fase móvel: *n*-propanol:água (6:2) + 0,5% de ácido acético; Revelador: orcinol:H₂SO₄.

Para verificar se alditóis, monossacarídeos livres, e/ou oligossacarídeos estavam presentes em AC, esta fração foi avaliada por GC-MS após acetilação direta (ACI), redução e acetilação (ACII), e hidrólise, redução e acetilação (ACIII). Os resultados, apresentados na Tabela 7, indicaram que na fração AC não há monossacarídeos livres, uma vez que seus acetatos de alditóis não foram observados em ACII. Contudo, foi verificada a presença de inositol livre. Quando a amostra foi previamente hidrolisada (ACIII), Ara, Man, Gal e Glc foram observados em maiores proporções, com uma diminuição proporcional do teor de inositol (Tabela 7). Estes resultados indicam que estes monossacarídeos podem estar envolvidos uns com os outros, por meio de ligações glicosídicas, formando oligossacarídeos, ou podem estar ligados a agliconas, formando glicosídeos.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO AC ACETILADA (ACI), REDUZIDA E ACETILADA (ACII), E HIDROLISADA, REDUZIDA E ACETILADA (ACIII).

Frações	Monossacarídeos (%)							inositol
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
ACI	-	-	-	-	-	-	-	100
ACII	-	-	-	-	-	-	-	100
ACIII	3,0	-	7,9	2,1	23,1	17,3	17,2	29,3

NOTAS: Análise de acetatos de alditóis por GC-MS. Rha (ramnose); Fuc (fucose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); GalA (ácido galacturônico).

A análise de RMN-¹³C da fração AC (Figura 29) revelou vários sinais na região de carbono anomérico (δ 105.2, 100.7, 100.1, 97.8, 95.9, 93.7, 91.7), característicos de carboidratos. Os sinais em δ 95.9, 93.7, 91.7, sugerem que unidades terminais redutores estejam presentes em AC. Na região do espectro de δ 60 a 80 estão presentes os sinais dos carbonos dos anéis de carboidratos, incluindo os sinais típicos entre δ 60 a 62 correspondentes aos C-6 das hexoses. Outros sinais

foram observados entre δ 120 a 135, característicos de carbonos com insaturações. Ainda, na região de δ 170 a 180, foram observados sinais característicos de grupos carboxílicos. Os sinais entre δ 35 a 45, provavelmente correspondem a $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$. Desta formas, os sinais de RMN- ^{13}C sugerem que, além do inositol e dos monossacarídeos que compõem esta fração, provavelmente compostos fenólicos podem estar presentes em AC. Estes compostos podem estar associados a carboidratos, formando glicosídeos.

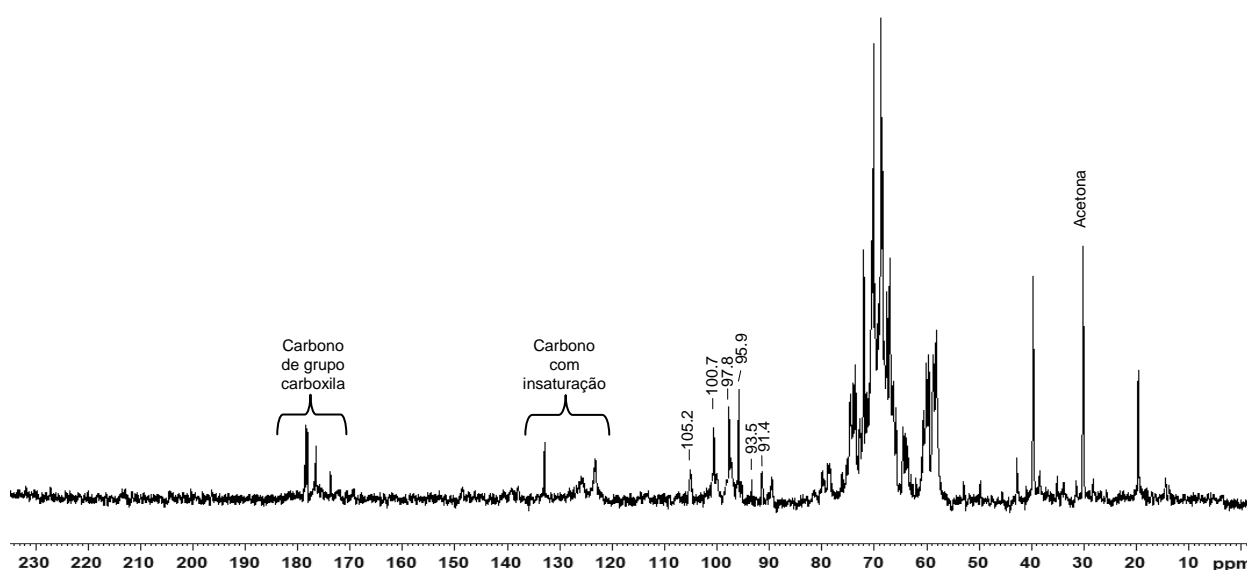


FIGURA 29 – Espectro de RMN- ^{13}C da fração AC (em D_2O), a 30 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

Com o objetivo de verificar de que modo os carboidratos presentes na fração AC estão ligados, foi realizada análise de metilação (Tabela 8). Os resultados indicaram que uma grande quantidade das unidades de hexoses (Man, Gal e Glc) está presente como terminal não redutor (12,7, 17,9 e 18,8%, respectivamente). Unidades de manose e galactose (1 \rightarrow 4)-substituídas e de galactose (1 \rightarrow 6)-substituídas também estão presentes em quantidades consideráveis (10,9, 14,7 e 12,2%, respectivamente). Também estão presentes em AC terminais não redutores de arabinose (3,4%) e xilose (3,8%), unidades de ramnose (1 \rightarrow 2)-substituídas (1,8%), e unidades de arabinose (1 \rightarrow 4)-substituídas (3,6%).

TABELA 8 – PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE AC.

Derivado Metilado	Ligações	$t_R^{(1)}$	AC
2,3,5-Me ₃ -Ara	terminal	0,803	3,4
3,4-Me ₂ -Rha	→)2-	0,957	1,8
2,3,5-Me ₃ -Xyl	terminal	0,965	3,9
2,3,4,6-Me ₄ -Man	terminal	0,992	12,7
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	terminal	1,000	18,8
2,3-Me ₂ -Ara	→)4-	1,030	3,6
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	terminal	1,052	17,9
2,3,6-Me ₃ -Man	→)4-	1,292	10,9
2,3,6-Me ₃ -Gal	→)4-	1,367	14,7
2,3,4-Me ₃ -Gal	→)6-	1,528	12,2

NOTAS: (1) t_R = tempo de retenção relativo ao do 2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol; Hex (hexose).

De acordo com os resultados obtidos para o fracionamento bioguiado de composto de baixa massa molar, é possível afirmar que a planta *S. oleracea* apresenta outro composto com atividade antinociceptiva além do espilantol ou de outras alcanidas. O espilantol (Figura 3), assim como as demais alcanidas, é um composto com característica apolar e, portanto, foi extraído da planta quando ela foi submetida à extração com clorofórmio:metanol (2:1, v/v) (Figura 20). Mesmo que traços de espilantol tenham permanecido no material após esse tratamento, quando a fração SE foi submetida à partição líquido:líquido, ele certamente ficaria retido na fração clorofórmio.

Portanto, embora ainda não tenha sido caracterizado o composto com atividade antinociceptiva, foi possível concentrá-lo na fração 4B. As frações 4BB, 4BAAC, AC e AM foram encaminhadas para o teste farmacológico.

5 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O polissacarídeo majoritário presente na fração RAACA, obtido por extração aquosa a partir da planta inteira de *S. oleracea* é uma arabinogalactana do tipo II. Ela é formada por uma cadeia principal de unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 3)-ligadas, substituída em O-6 por cadeias laterais de β -D-Galp (1 \rightarrow 6)-ligadas. As cadeias laterais são substituídas em O-3 por terminais não redutores de α -L-Araf. Esta arabinogalactana do tipo II provavelmente está ligada na posição O-4 de algumas unidades de ramnose, de uma ramnogalacturonana do tipo I, formada pela repetição da unidade dissacarídica [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow].
- O polissacarídeo obtido por extração aquosa das folhas de *S. oleracea* mostrou-se homogêneo na análise por cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC), com M_w de 226.000 g/mol ($dn/dc=0,140$). Análises de RMN e metilação mostram que o polissacarídeo SC é composto por uma ramnogalacturonana do tipo I, formada por uma longa cadeia de \rightarrow 4)-6-OMe- α -D-GalpA-(1 \rightarrow , intercalada por umas poucas unidades de α -L-Rhap, parcialmente substituídas por cadeias laterais de arabinogalactana do tipo II.
- A avaliação da atividade antiúlcera gástrica do polissacarídeo SC, em ratos, demonstrou que ele é capaz de reduzir a lesão gástrica induzida por etanol de maneira dose-dependente, com uma ED_{50} de 1,5 mg/kg. Estes resultados sugerem uma atividade potencial de SC para atuar como um agente citoprotetor, podendo se ligar à superfície da mucosa gástrica, funcionando como uma camada protetora.
- O processo de fracionamento bioguiado do sobrenadante etanólico da extração aquosa (SE), obtido a partir da planta inteira de *S. oleracea*, gerou uma fração com grande atividade antinociceptiva (4B). De acordo com o processo de extração e fracionamento realizados, espilantol e outras alcanidas tradicionalmente associadas às propriedades anestésicas e analgésicas observadas para a planta, não estão

presentes nesta fração. Isso indica que outros compostos presentes em *S. oleracea* possuem atividade antinociceptiva.

REFERÊNCIAS

- ADLER, R. J.; ADLER, R. **Composition to treat microbial infections e.g. oral pathogenic micro-organisms, comprises a mixture of e.g. radix polygonic multiflora, *Fructus corni*, *Cuscuta japonica*, *Rehmania glutinosa*, licorice, asparagines, Derla and rographis, and a mixture of *Salvia persica*, *Achyranthes aspera*, *Spilanthes acmella*, clove, *Picus bengalensis*, *Acacia nilotica* resin, eucalyptus, mint, green tea and bamboo silica.** WO2006059196, Jun. 08, 2004.
- ASPINAL, G. O. In: **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1973. p. 95-115.
- ASPINAL, G. O. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982. v. 1, 503p.
- ASPINAL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 473-500.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 143.
- BALLAL BB. **Herbal drug against HIV infection and AIDS comprises root powder of *Spilanthes acmella***. IN200501512-I3, Jan. 13, 2006.
- BORGES-DEL-CASTILLO, J.; VASQUEZ-BUENO, P.; SECUNDINO-LUCAS, M.; MATRINEX-MARTIR, A. I.; JOSEPH, P. The n-2phenylethylcinnamamide from *Spilanthes ocymifolia*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2671-2672, 1984.
- BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, 194p. 1990.
- CAPEK, P.; HRIBALOVÁ, V.; SVANDOVÁ, E.; EBRINGEROVÁ, A.; SASINKOVÁ, V., MASAROVÁ, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 113-119, 2003.
- CARPITA, N. C.; GIBAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.
- CAVALCANTI, V. M. S. **Extração de espilantol de *Spilanthes acmella* var. *oleracea* com dióxido de carbono supercrítico**. 165f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; RITA, S.; SHARATCHANDRA, K.; SINGHT, T. I. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian J. Pharmacology**, n46, p. 148-150, 2004.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; SANJEBAM, R.; KHUMBONG, S.; THOKCHOM, I. S. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animals models. **Indian J. Pharmacology**, n42, p. 277-279, 2010.

CHO, C. H.; MEI, Q. B.; SHANG, P.; LEE, S. S.; SO, H. L.; GUO, X. LI, Y. Study of the gastrointestinal protective effects of polysaccharides from *Angelica sinensis* in rats. **Planta Medica**, v. 66, p. 348-351, 2000.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, L. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal, **Food Chemistry**. V115. p. 687-690, 2009a.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S. Polysaccharide from a tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p.274–278, 2008.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. IACOMINI, M. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p.361-363, 2009b.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CORDEIRO, L.M.C, REINHARDT, V.F., BAGGIO, C.H., WERNER, M.F.P, BURCI, L.M., SASSAKI, G.L. IACOMINI, M. Arabinan and rabinarich-pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Food Chemistry**, Volume 130, Pages 937-944, 2012.

CRUZ, F. G.; AZNAR, M.; DELARCINA JÚNIOR, S.; MELO, A. B. V.; CAVALCANTI, V. M. **Processo de extração de compostos ativos de material vegetal**. PI0802052-3 A2, 03 de Novembro, 2009.

DELARCINA JÚNIOR, S.; CAGNON, J. R.; SILVA, A. R.; FUKUSAWA, V. E. N. **Processo de preparação de extrato de jambú, uso do referido extrato, composições cosméticas compreendendo o mesmo e produtos cosméticos compreendendo as ditas composições cosméticas**. PI0500886-7 A, 21 de novembro, 2006.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudates: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 320, p. 167-175, 1999.

DERMANE, F.; PASSARO, G. **Use of na *Acmella oleracea* extract for the botox-like effect thereof in na anti-wrinkle cosmetic composition.** US2008/0069912 A1, Mar. 20, 2008.

DERMANE, F.; PASSARO, G. **Utilização de espilantol e processo de tratamento cosmético de rugas.** PI0506449-0 A, 26 de dezembro, 2006.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMADKOVÁ, Z.; ALFODI, J.; HRIBALOVÁ, V. The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: extractily, structure and properties. **Carbohydr. Polym.**, v. 37, p. 231-239, 1998. ET AL., 1998.

EKANEM, A. P.; WANG, M.; SIMON, J. E.; MORENO, D. A. Antiobesity properties of two African plants (*Afromomum meleguetta* and *Spilanthes acmella* by pancreatic lipase inhibition. **Phytoterapy Research**, v. 21, p. 1253 – 1255, 2007.

FANG, L. **Chinese medicine composn. For colds – contains *Scaly holly root, Clerodendron philippinum schauer, Syzygium jambos, Spilanthes acmella* and *Atropa belladonna*.** CN1079394-A, Dec. 15, 1993.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.)R.K. Jansen (Asteracea) – Jambu. **Revista Fitos**, v 5, n.1, p. 83-90, 2010.

FENGEL, D.; WEGNER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: Gruyter, W. 1989. 613p.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

FORTUNE STAR INVESTMENT CORP. **Herbal composition, useful for treating athlete's foot and Trichophyton mentagrophytes, comprises *Coptis chinensis, Phellodendron amurense, Scutellaria baicalensis, Spilanthes acmella* and *Glycyrrhiza glabra*.** DE2020080112465-U1, Apr. 09, 2009.

GREGER, H. Alkamides: Structural relationships, distribution and biological activity. **Planta Medica**, p. 366-375, 1984.

HAUS SHOKUJIN KOGYO CO. LT. **Food and drink – contg *Spilanthes acmella* extract.** JP73035465-B, Dec. 14, 1970.

HELDT, H.W. **Plant biochemistry and molecular biology.** New York: Oxford Academic Press., p. 6-8, 1997.

HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella oleracea*: compositae. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 20, n. 1, p. 31-39, 2003.

IKEDA, T. **Skin external preparation e.g. basic cosmetics, makeup cosmetics, and body cosmetics for tightening skin, reducing wrinkles and preventing aging of skin comprises extract of root of *Spilanthes acmella*.** JP2009073800-A, Apr. 09, 2007.

JACOBSON, M. The structure of spilanthol. **Chemistry and Industry**, n.2, p.50-51, 1957.

JANSEN, R. K. The systematics of *Acmella* (Asteracea-Heliantheae). **Systematic Botany Monographs**, v. 8, p. 1- 115, 1985.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Journal of Chemistry Society, Chemistry Communications**, v. 48, p. 1-70, 1976.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Companhia Nacional LTDA, 1993, 777 p.

KAKURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydr. Polym.**, v. 43, p. 195-203, 2000.

KARDOSOVÁ, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFODI, J.; NOSAL'OVA, G.; MATAKOVA, T.; HRIBALOVA, V. Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. **Carbohydr. Polym.**, v. 57, p. 165-176, 2004.

KOMALAVIVAS, P.; MORT, A. J. The acetylation at O-3 of galacturonis acid in the thamnose-rich portion of pectins. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 189, p. 261-272, 1989.

LEROUGE, P., O'NEILL, M. A., DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P. Structural characterization of *endo*-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. **Carbohydrate Research**, v. 243, p. 359-371, 1993.

LEY, J. P., KRAMMER, G., LOOFT, J.; REINDERS, G.; BERTRAM, H. J. Structure activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkanamides related to spilanthol. **Flavour Science: Recent Advances and Trends**. p. 21-24, 2006.

LÓPEZ-BUCIO, J.; ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G.; RAMIREZ-CHÁVEZ, E. MOLINA-TORRES, J. HERRERA-ESTRELA, L. Novel signals for plant development. **Plant Biology**, v 9, p. 523-529, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa : Instituto plantarum de estudos da Flora LTDA, 2002, 512p.

MARLETT, J. A.; FISHER, M. H. The active of psyllium seed husk. **Proceed. Nutr. Soc.**, v. 62, p. 207-209, 2003.

MATSUMOTO, T.; MORIGUCHI, R.; YAMADA, H. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by hydrochloric acid/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 535-539, 1993.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I. LILA, M. A. Isolation and identification of antiplasmodial N-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1886-1892, 2011.

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; NOLETO, G. R.; CIPRIANI, T. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of na arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1479-1483, 2005.

MELLINGER, C. S.; SIMAS, F. T.; SCHIAVANI, D. N.; WERNER, M. F. P., BAGGIO, C. H., PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; GORIN, P. A., IACOMINI, M. Isolation of a gastroprotective arabinoxylan from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 10524-10528, 2011.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, Oxford, v.47, p. 715-721, 1998.

MOLINA-TORRES, J. M., CHAVEZ, A. G. Alcamidas em plantas: distribucion e importancia. **Avance y Perspectiva**, v.20, p.377-387, 2001.

MOLINA-TORRES, J.; CHAVEZ, A. G.; CHAVEZ, E. R. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 64, p. 241 – 248, 1999.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent alkamides from *Spilanthes acmella* L. Var. *oleracea* Clarke. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n.5, p. 759-762, 1992.

NATURAL PROD KK. **Insect killing and insect controlling agent for use on plant leaf surface, contains neem oil, black pepper oil, *Piper longum* oil, *Spilanthes acmella* oil, and/or *Datura metel* oil.** JP2002363012-A, Dec. 18, 2002.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.

NEWBURG, D. S.; RUIZ-PALACIOS, G. M.; MORROW, A. L. Human Milk glycans protect infant against enteric pathogens. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 25, p. 37-58, 2005.

NIGRINIS, L. S. O., CARO, J. O., OLARTE, E. N. Estudio Fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las flores de la *Spilanthes americana* (Mutis) parte I: Estudio Fitoquímico. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 15, p.37-47, 1986.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; THOMASZSOCCOL, V.; OLIVEIRA, M. B. M. effects os a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 233, p. 73-83, 2002.

O'NEILL, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. The pectic polysaccharides os primary cell walls. In: DEY, D. M. **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1990, p. 415-441.

OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; PADERIN, N. M.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. **Food Chemistry**, v. 114, p. 610-615, 2009.

PHRUTIVORAPONGKUL, A.; CHAIWON, A.; VEJABHIKUL, S.; NETISINGHA, W. CHANSAKAOW, S. An anesthetic alkamide and fixed oil from *Acmella oleracea*. **J. Health Res.** v. 22, p. 97-99, 2008.

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G., GOLOVCHENKO, V. V., PUPOVA, G. Y., VIATYASEV, F. V., SHASHKOV, A. S., OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, v. 124, p. 309-315, 2011.

PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: **Hemicellulose and hemicellulases**., London: Portland Press Research Monograph, 1993, p. 1-27.

RAMSEWAK, R. S., ERICKSON, A. J., NAIR, M. G. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v.51, p. 729-732, 1999.

RANER, G. M.; CORNELIUS, S.; MOULICK, K.; WANG, Y.; MORTENSON, A.; CECH, N. B. Effects of herbal products and their constituents on human cytochrome P450_{2E1} activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2359 – 2365, 2007.

RATNASOORIYA, W. D, PIERIS, K. P. P., SAMARATUNGA, U., JAYAKODY, J. R. A. C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, n.2-3, p.317-320, 2004.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 205-236.

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. F.; THIBAULT, J. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 271-280, 1998.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas sustentáveis**. Manaus : INPA, 405p, 2001.

ROBERT, A. ; NEZAMIS, J. E. ; LANCASTER, C., HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

SAEMAN, J. F.; MOORE, W. E.; MITCHELL, R. L.; MILLET, M. A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Technical Association of Pulp and Paper Industry**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SANMUGAPRIYA, E.; VENKATARAMAN S. Antiulcerogenic potential of *Strychnos potatorum* Linn seeds on Aspirin plus pyloric ligation-induced ulcers in experimental rats. **Phytomedicine**, v. 14, p. 360-365, 2007.

SANZ, M. L.; COTE, G. L.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Prebiotic properties of alternansucrose maltose-acceptor oligosaccharides. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 5911-5916, 2005.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. (Eds.). **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2008. p. 255-276.

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2003. p. 403, 498.

SOUZA V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SRIVASTAVA, R.; KULSHVESHTHA, D. K. Bioactive polysaccharides from plants, **Phytochemistry**, v. 28, p. 2877-2883, 1989.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINAL, G. O. (ed.). **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. v. 2, p. 97-180.

SUN, X. B., MATSUMOTO, M., YAMADA, H. Anti-ulcer activity and mode of action of the polysaccharide fraction from the leaves of *Panax ginseng*. **Planta Medica**, v. 58, p. 432-435, 1992.

TAKASAGO PERFUMERY CO LTD. **Cleaning agent contains spirantol – contains spirantol prepd. by extracting dried *Spilanthes acmella* with alcohol**. JP6072858-A, Aug. 26, 1992.

TANAKA, L. Y. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; MARQUES, M. C. A.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; GORIN, P. A. J.; SASSKI, G. L.; IACOMINI, M. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 714-721, 2010.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. Alcamidas em plantas: distribución e importância. **Avance y Perspectiva**, v. 20, p. 377-387, 2001.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H.; DIAZ, S. C.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promissórios de la Amazônia**. Lima: TCA; Secretaria Protempore, p. 322- 327, 1996.

VULPI, T. S.; MORAIS, C. P. M.; TRINDADE, A. P. F.; LIMA, M. C. H. P.; VELOZO, L. S. M. KAPLAN, M. A. Análise do óleo essencial dos diferentes órgãos de *Acmella ciliata* Kunth (Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 1128-1130, 2007.

WHISTLER, R. L. **The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry**. London: Academic Press, 1970. p. 447-458.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M. L., THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

WU, L.; FAN, N.; LIN, M.; CHU, I.; HUANG, S.; HU, C.; HAN, S. A.; Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **J. agric. Food Chem.** v. 56, p. 2341 – 2349, 2008

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 269-276, 1994.

YE, Y. N., SO, H. L., LIU, E. S. L., SHIN, V. Y., CHO, C. H. Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. **Life Sciences**, v. 72, p. 925-932, 2003.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-110, 1983.